

**Univerzita Karlova v Praze  
Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Botanika



Bc. Nikol Krejčová

**Hybridizace mezi *Pulsatilla pratensis* a *P. patens*?  
Skutečnost nebo mýtus?**

*Interspecific hybridization between *Pulsatilla pratensis* and *P. patens**

Diplomová práce

Školitel: doc. RNDr. Jan Suda, Ph.D.

Praha, 2014

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 13. 8. 2014

Nikol Krejčová



## Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala své mamince, Markétě Krejčové, za důvěru v mé studium a za velkou pomoc s terénní částí mého výzkumu. Svému tatškovi, Jiřímu Krejčímu, a všem svým prarodičům pak chci poděkovat za jejich neustálou podporu po celou dobu mých studií. Svému partnerovi, Martinovi Markovi, děkuji za velkou pomoc se sběrem vzorků a za podporu.

Svému školiteli, Honzovi Sudovi, chci vyjádřit svůj velký dík za cenné rady a důvěru v mé schopnosti. Poděkovat chci také všem lidem na katedře za přátelskou atmosféru a ochotu pomoci, hlavně pak Tomovi Urfusovi, Kristí Šemberové, Jirkovi Neustupovi a Kátě Hanušové. Svým přátelům děkuji za pochopení a podporu, Karlovi Neprašovi pak za mnohé rady. Pracovníkům ochrany přírody děkuji za povolení sběru rostlin na všech mnou vybraných lokalitách. Svě alma mater děkuji za zprostředkování mnohého poznání.

Přírodě pak chci poděkovat za to, že mi umožnila práci provést a dokončit.

## Abstrakt

Tato diplomová práce se zabývá hybridizací dvou druhů rodu *Pulsatilla*, a to *P. patens* a *P. pratensis* v České republice. Cílem bylo zhodnotit karyologickou a morfologickou variabilitu zájmových (noto)taxonů. Průtokové cytometrie odhalila 3 skupiny s odlišnou velikostí genomu, odpovídající *P. patens*, *P. × hackelii* a *P. pratensis*. Celková frekvence mezidruhově hybridizace byla nízká (pouze zhruba 3% analyzovaných jedinců). Mezi nejdůležitější druhově-specifické znaky, které umožňují spolehlivou determinaci, patří počet jařem, délka řapíku lístku, počet úkrojků lístku a barva květu. U jedinců křížence *P. × hackelii* byla pozorována tvorba květů i semen, ale jeho fertilita je výrazně snížena. Mezidruhově hybridizace tak nejspíše nepředstavuje významné riziko pro genofond studovaných druhů.

**Klíčová slova:** *Pulsatilla patens*, *Pulsatilla pratensis*, *Pulsatilla × hackelii*, hybridizace, velikost genomu, průtoková cytometrie, ochránářská biologie.



## Abstract

This thesis deals with interspecific hybridization in sympatric populations of *Pulsatilla patens* and *P. pratensis*. The key aim was to assess karyological and phenotypic variation in the study group. DNA flow cytometry revealed three non-overlapping groups of genome sizes, corresponding to *P. patens*, *P. × hackelii* and *P. pratensis*. The frequency of interspecific hybridization was low, accounting to approx. 3% of analyzed plants. Morphometric analyses identified a set a reliable species-specific characters, including number of divisions the leaf, length of petiole the part of leaf, number of smaller parts of leaf and colour of blossom. Although the majority of hybrid individuals flowered and set fruits, their fertility was reduced considerably. The threat from interspecific hybridization to parental species is therefore rather low.

**Key words:** *Pulsatilla patens*, *Pulsatilla pratensis*, *Pulsatilla × hackelii*, hybridization, genome size, flow cytometry, conservation biology.

# Obsah

<b>1. Úvod</b>	1
<b>2. Teoretický úvod</b>	2
2.1 Taxonomické zařazení	2
2.2 Rod <i>Pulsatilla</i> (L.) Mill	3
2.2.1 Morfologický popis	5
2.2.2 Ekologie	5
2.2.3 Ohrožení a ochrana	6
2.3 Mikroevoluční procesy	7
2.3.1 Polyploidizace	8
2.3.2 Mezidruhová hybridizace	8
2.3.3 Rizika hybridizace a introgrese	10
2.4 Velikost genomu	10
2.5 Mikroevoluční procesy v rodu <i>Pulsatilla</i>	11
2.5.1 Polyploidizace	11
2.5.2 Hybridizace	11
2.6 <i>Pulsatilla patens</i> (L.) Mill. (koniklec otevřený)	13
2.6.1 Morfologický popis	13
2.6.2 Karyologie	14
2.6.3 Taxonomické členění	14
2.6.4 Výskyt v České republice	15
2.6.5 Ohrožení a ochrana	15
2.7 <i>Pulsatilla pratensis</i> (L.) Mill. (koniklec luční)	16
2.7.1 Morfologický popis	17
2.7.2 Karyologie	18
2.7.3 Taxonomické členění	18
2.7.4 Výskyt v České republice	19
2.7.5 Ohrožení a ochrana	19
2.8 Hybridizace druhů <i>Pulsatilla patens</i> a <i>Pulsatilla pratensis</i>	20
2.8.1 Morfologie hybrida <i>Pulsatilla</i> × <i>hackelli</i>	20
2.8.2 Karyologie <i>Pulsatilla</i> × <i>hackelli</i>	21

2.8.3 Fertilita <i>Pulsatilla</i> × <i>hackelli</i> .....	21
2.8.4 Výskyt <i>Pulsatilla</i> × <i>hackelli</i> .....	21
2.9 Teoretický úvod k použitým metodám .....	21
2.9.1 Průtoková cytometrie .....	22
2.9.2 Morfometrické analýzy .....	23
2.9.3 Analýza životaschopnosti pylových zrn.....	24
2.9.4 Analýza semen .....	25
<b>3. Metodika .....</b>	<b>25</b>
3.1 Sběr vzorků.....	25
3.2 Zpracování vzorků .....	30
3.3 Průtoková cytometrie .....	31
3.4 Morfometrické analýzy .....	32
3.5 Analýza životaschopnosti pylových zrn .....	35
3.6 Analýza semen.....	36
<b>4. Výsledky .....</b>	<b>36</b>
4.1 Průtoková cytometrie .....	36
4.2 Morfometrické analýzy .....	40
4.2.1 Ordinační metody.....	40
4.2.2 Neparametrický Spearmanův test .....	42
4.2.3 Diskriminační metody .....	42
4.4 Analýza životaschopnosti pylových zrn .....	50
4.5 Analýza semen.....	51
4.6 Určovací klíč .....	52
4.7 Popis taxonů .....	53
<b>5. Diskuse .....</b>	<b>54</b>
5.1 Frekvence hybridizace druhů <i>P. patens</i> a <i>P. pratensis</i> .....	54
5.2 Fenotyp hybrida <i>Pulsatilla</i> × <i>hackelli</i> .....	59
5.3 Fertilita hybrida <i>Pulsatilla</i> × <i>hackelli</i> .....	61
5.4 Důsledky hybridizace druhů <i>P. patens</i> a <i>P. pratensis</i> pro ochranu přírody.....	62
<b>6. Závěr .....</b>	<b>63</b>
<b>7. Použitá literatura .....</b>	<b>65</b>
<b>8. Přílohy .....</b>	<b>70</b>

# 1 Úvod

Rod *Pulsatilla* (L.) Mill. (koniklec) obsahuje asi 30 druhů rostoucích v mírném pásmu severní polokoule (Aichele et Schwegler 1957).

Koniklece mají úzké ekologické amplitudy a v současnosti se jejich populace na mnoha místech výrazně snižují vlivem lidské činnosti, mnohé druhy jsou tak chráněné zákonem (Grulich 2012; Hensen et al. 2004; IUCN 2014; Walker et Pinches 2011).

Taxonomická situace v rodu *Pulsatilla* je složitá, neboť druhy jsou velmi variabilní a bylo popsáno velké množství poddruhů a variet.

V rodu se často objevují mikroevoluční procesy jako je hybridizace a polyploidizace. Obzvlášť hybridizace je popisována v rodu velmi často, reprodukční bariéry se považují za velmi slabé nebo neexistující (Krause 1958). Existuje velké množství popsaných hybridů mezi různými druhy konikleců (Hegi et Weber 1975).

Hybridizace však může mít různý význam pro rodičovské druhy i hybridy, může vést ke speciaci, ale může také ohrožovat populace rodičovských druhů (Mallet 2007).

V České republice se vyskytují 4 kříženci konikleců *Pulsatilla* × *hackelii* Pohl, *Pulsatilla* × *celakovskyana* Domin, *Pulsatilla* × *intermedia* Lsch., *Pulsatilla* × *mixta* Halácsy (Petříček et Kolbek 1996; Skalický 1997). *Pulsatilla* × *hackelii*, vznikající hybridizací druhů *P. pratensis* a *P. patens*, byl popsán z našeho území z vrchu Hradiště v Českém středohoří a jeho výskyt byl hlášen z dalších 16 lokalit. Tato práce se zabývá především frekvencí výskytu a fertilitou hybrida *P. × hackelii*. Vzhledem k ohrožení obou rodičovských druhů je pak dalším cílem prověřit vliv hybridizace na rodičovské druhy. Samostatný okruh otázek pak tvořila fenotypová variabilita a druhově-specifické znaky rodičovských druhů i jejich křížence. Pro analýzy byly zvoleny moderní biosystematické metody (průtoková cytometrie, morfometrické analýzy, analýza pylu a analýza semen).

Otázky, na které chce odpovědět tato diplomová práce:

- Jaká je populační struktura smíšených populací druhů *P. patens* a *P. pratensis*?
- Jaká je celková frekvence výskytu hybrida *Pulsatilla* × *hackelii*?
- Jakými morfologickými znaky se hybrid *P. × hackelii* vyznačuje?
- Je hybrid *Pulsatilla* × *hackelii* fertilní? Pokud ano, vznikají zpětní hybridy?
- Jaký vliv má existence hybrida *P. × hackelii* na populace rodičovských druhů?

## 2 Teoretický úvod

### 2.1 Taxonomické zařazení

Rod *Pulsatilla* L. (koniklec) je řazen do čeledi Ranunculaceae Juss. (pryskyřníkovité). Podle nejnovějšího systému APG III patří čeleď Ranunculaceae do řádu Ranunculales (pryskyřníkotvaré), který je dále řazen do třídy Eudicots (vyšší dvouděložné). Eudicots je součástí a ty skupiny kmene Magnoliophyta (krytosemenné).

Řád Ranunculales je jednou z bazálních skupin dvouděložných rostlin a je do něj řazeno 7 čeledí (Eupteleaceae K. Wilh., Lardizabalaceae R. Br., Circaeasteraceae Hutch., Menispermaceae Juss., Berberidaceae Juss., Ranunculaceae Juss., Papaveraceae Juss.). Jedná se převážně o byliny, které mají spirocyklické květy s nektárii vzniklými z korunních lístků. Semena vynikají velkým endospermem (Stevens 2014).

Čeleď Ranunculaceae obsahuje 62 rodů a 2 450 druhů (Simpson 2006). Její stáří je odhadováno na 87-73 milióny let (Anderson 2005).

Rostliny čeledi Ranunculaceae jsou vodní nebo suchozemské, převážně byliny, ale najdeme mezi nimi také keře a liány. Jejich květy jsou většinou oboupohlavné, pravidelné nebo souměrné. Objevuje se okvětí i rozlišení na kalich a korunu. Gyneceum je apokarpní. Plodem je většinou měchýřek nebo nažka, méně často bobule nebo tobolka. Jsou pěstovány pro okrasné a medicínské účely, ale jsou to také významné plevely a jedovaté rostliny pro chované živočichy (Simpson 2006).

Mezi nejpočetnější rody patří *Ranunculus* L. (600), *Delphinium* L. (400), *Aconitum* L. (300), *Clematis* L. (325), *Anemone* s.l. L. (190), (Stevens 2014).

Rod *Pulsatilla* je někdy zařazován do rodu *Anemone* s. l. (sasanka). Původně vedla ke spojování obou rodů autory jejich morfologická podobnost (Linné 1753). Sdílené morfologické znaky obou rodů: Jsou to vytrvalé byliny s oddenkem, jejich listy jsou členité nebo složené, přízemní. Stonek nese jeden květ. Květ je nápadný, barevný a má pomnožené tyčinky i pestíky. Plodem je souplodí mnoha nažek, které jsou opatřeny chlupatými přívěsky pro anemochorii (Skalický 1997).

Rod *Anemone* s.l. je v současnosti používán např. v Kanadě a v USA (Aiken et al. 2007; Whittemore 1997), zatímco v Asii a Evropě se používá rozdělení na rod *Anemone* a *Pulsatilla* (Borodina-Grabovskaja et al. 2007; Hensen et al. 2004; Skalický 1997; Sun 2013).

Molekulární studie se ve svých výsledcích liší. Zařazení rodu *Pulsatilla* spolu s rodem *Hepatica* do rodu *Anemone* navrhuje Hoot et al. (1994) na základě studie chloroplastové DNA a morfologie rodu *Anemone*. Blízkou příbuznost obou rodů udává na základě studie chloroplastové DNA čeledi *Ranunculaceae* Johansson (1995). Naopak pouze vzdálenější příbuznost potvrzuje Ro et al. (1997). Oddělení obou rodů podporuje i studie chloroplastové DNA a podobnosti morfologických znaků, která za dobu oddělení považuje pozdní miocén (dobu před 9, 6 – 7,7 milióny lety; Ehrendorfer 2009).

## 2.2 Rod *Pulsatilla*

Centrum diverzity rodu *Pulsatilla* (L.) Mill. leží ve stepích střední a východní Asie, především pak v pohoří Ťan-šan. Zástupců rodu je okolo 30. Rostou na severní polokouli, v Americe, Evropě i Asii, a to v mírném podnebí od 30. rovnoběžky až po severní polární kruh (Aichele et Schweigler 1957).

Koniklece jsou druhy s úzkými ekologickými amplitudami a těžce se proto přizpůsobují změnám ekologických podmínek (Moore 1964). V dobách ledových a meziledových se tak přesouvaly do míst, kde zrovna byly stepi (v dobách ledových například do střední Evropy, v dobách meziledových se pak stahovaly například do severní Evropy, do střední Asie nebo do vyšších poloh ve střední Evropě). Obzvláště v refugiích se druhy setkávaly a udržoval se tak mezi nimi genový tok (Willis et Niklas 2004). Rozrůznění jednotlivých druhů konikleců tak trvalo velmi dlouho a reprodukční bariéry se pravděpodobně vytvořily pouze částečně nebo se nevytvořily vůbec (Ehrendorfer 2009; Lindell 1998). V rodu se často uplatňují mikroevoluční procesy jako je hybridizace a polyploidizace. Zvlášť hybridizace je v rodu velmi častá. Je popsáno velké množství hybridů in-situ (11 ve střední Evropě), ale další hybridizace jsou dokládány i experimentálně (Lindell 1998). Někteří autoři dokonce popisují existenci celých hybridních komplexů druhů včetně hybridních zón mezi jednotlivými druhy (Zimmermann 1964).

V rodu koniklec je ale popisována také velká fenotypová variabilita v rámci druhů, poddruhů i populací, přičemž není jasné, zda někteří popsaní hybridi nejsou ve skutečnosti extrémně variabilní jedinci, nebo naopak zda někteří morfologicky odlišní jedinci nejsou hybridy či zpětnými hybridy. Jen v Evropě je popsáno 10 druhů a 25 poddruhů rodu *Pulsatilla* (Hegi et Weber 1975; Moore 1964). Morfologické popisy některých druhů a poddruhů se

navíc překrývají (například *Pulsatilla grandis* ze střední Evropy a *P. vulgaris* z Evropy severozápadní).

Latinské jméno *Pulsatilla* pochází ze slova pulsare, zvonit, někdy používané označení *Anemone* má původ pravděpodobně v řeckém slově pro vítr, české jméno koniklec vzniklo zkomolením staročeského poniklec, které odkazuje na poniklý, pozdějším slovem níci, tedy svěšený dolů, což stejně jako pulsare odkazuje na zvonkovité svěšené květy některých konikleců. Indiáni nazývali koniklece v překladu do angličtiny Ears of the Earth (Uši Země), neboť věřili, že prerie jimi poslouchá, jestli už přichází letní období (Aiken et al. 2007). Slovenské označení rodu je poniklec, anglické pasqueflower, prairie smoke, prairie-crocus, ruské son-trava, slovinské sasa, německé Kuhschelle (Aiken et al. 2007; Polívka 1900). Všechny koniklece obsahují glykosidický lakton ranunkulin, který je v těle živočichů enzymaticky štěpen na jedovatý protoanemonin a glukosu. Listy obsahující větší množství ranunkulinu než květy, se vyznačují ostře pálivou chutí, a jsou proto okusovány méně, jak nápadné a chutnější květy (Kubát 1997).

Sušením se ranunkulin mění na inaktivní dimer anemonin (Skalický 1997). Pro své obsahové látky jsou však koniklece také využívány jako léčivé rostliny. Ve střední Evropě se užívaly tinktury a čaje ze sušených listů a kořenů, a to proti dně, revmatismu, křečím, zánětům reprodukčních orgánů i kůže, astmatu a na uklidnění (Jahodář 2006).

Původní Američané v celé Severní Americe používali na léčení listy konikleců, čerstvé listy na obklady proti revmatismu a neuralgii, rozdrcené listy kouřili proti bolestem hlavy a krvácení z nosu, odvar z kořenů pili na plicní problémy (Moerman 1986). Čínská medicína používá koniklece proti onemocněním způsobeným bakteriemi a trichomonádami (např. proti vaginální trichomonáze; Sun 2013). Farmakologické studie objevily v koniklecích například triterpenoidní saponiny, fytosteron, anthokyany a zjistily příznivé účinky konikleců na hypoglykémii, nervovou soustavu, kognitivní funkce a odhalily i cytotoxické vlastnosti, které zabraňují růstu nádorů (Sparg 2004). Samotný jedovatý anemonin má pak antibiotické vlastnosti. V současnosti se léčivých účinků, hlavně druhu *Pulsatilla pratensis*, masově využívá v homeopatii (Schrenk et al. 2013). Koniklece jsou také hojně využívány jako okrasné rostliny, pro účely pěstování bylo vyšlechtěno mnoho nových odrůd se speciálními znaky.

V současnosti je mnoho druhů konikleců považovaných za ohrožené, neboť se jejich populace významně snižují (Grulich 2012; IUCN 2014; Juśkiewicz-Swaczyna 2010; Uotila 1996).

### 2.2.1 Morfologický popis

Koniklece jsou vytrvalé rostliny. Kvůli náročným životním podmínkám (chlad, vítr a prudké sluneční záření) jsou hustě pokryty chlupy. Mají přízemní růžici listů, kterých může být až dvanáct. Listy jsou zpeřené nebo složené, v mládí hodně chlupaté. Hlavní kořen je kulovitý nebo vřetenovitý, stářím tmavne až do černo-hněda. Postupně se tvoří kořeny adventivní. Hypokotyl se mění v oddenek, který má více pupenů, z nichž vyrůstají další listové růžice (Hegi et Weber 1975).

Stonek může být také chlupatý, nese vždy jeden květ, jehož pupen je kryt brakteolem, útvarem vzniklým srůstem zpravidla tří přeslenovitě uspořádaných listenů. Brakteol je tvořen úzkými úkrojky. Během vývoje květu v plody se květní stopka i celá lodyha výrazně prodlužují (Goliašová 1982).

Oboupohlavné květy jsou poměrně velké, tvořené šesti stejnobarevnými okvětními lístky, uspořádanými ve dvou kruzích. Okvětní lístky jsou na vnější straně chlupaté. Barva květů může být fialová, modrá, červená, růžová, žlutá nebo bílá, barviva tvoří převážně delfinidinové glykosidy. Dochází k pomnožení tyčinek i pestíků až na počet okolo 100, jejich uspořádání je spirálovité. Vnější tyčinky se přeměňují na staminodální nektaria (Skalický 1997).

Květy jsou velmi nápadné, entomogamní, opylují je včely, čmeláci a další hmyz. Koniklece jsou rostliny alogamické, vyskytuje se u nich protogynie, ale pokud nedojde k opylení cizím pylem, jsou schopny autogamie (Torvik et al. 1998).

Plody jsou nažky uspořádané v souplodí, každá nažka je opatřena několik centimetrů dlouhým chmýrem pro usnadnění anemochorie (Hegi et Weber 1975; Skalický 1997).

### 2.2.3 Ekologie

Koniklece jsou světlomilné a teplomilné rostliny, které nesnáší zarůstání, a to nejen kvůli možnému nedostatku světla, ale hlavně neschopnosti konkurovat zdatnějším druhům.

Jsou tak součástí ekosystému suchých až mírně vlhkých travinných porostů (préríí, stepí, suchých trávníků), často rostou také na teplých nezarostlých svazích či skalách, nejčastěji na severních a západních expozicích. Nejčastěji se jedná o společenstva řádu *Festucetalia valesiacae* svazu *Koelerio-Phleion phleoidis*, méně často řádu *Trifolio arvensi-Festucetalia ovinae* svazu *Arabidopsion thalianae*, vzácně řádu *Origanetalia vulgaris* svazu *Geranium sanguinei*.



Objevují se ale také v lemech a světlinách lesům (například reliktních borů či doubrav) a křovin, jedná se o společenstva řádu *Quercetalia pubescenti-petraeae* a řádu *Erico-Pinetalia* svazu *Erico-Pinion*,

Půdy na stanovištích konikleců jsou suché nebo vysychavé, mělké a minerální (písčité nebo kamenité), především typu ranker.

Matečné horniny půd bývají silikátové nebo neutrální, např. trachyt, nefelinit, čedič, břidlice, vápnité pískovce, ale i váté písky. Půdy jsou většinou kyselé s pH mezi 4 a 6 (Chytrý et al 2001; Skalický 1997). Stejně jako pro jiné druhy narušených stanovišť, je pro koniklece zásadní mykorhizní symbióza, na které jsou závislé především v prvních fázích života (Moora 2004).

#### 2.2.4 Ohrožení a ochrana

Snižování populací různých druhů rodu *Pulsatilla* se v současnosti děje po celém světě (IUCN 2014). Koniklece totiž mají velmi úzkou ekologickou amplitudu a nejsou schopny se přizpůsobovat současným velkým změnám způsobeným lidmi. Velký dopad měla na populace konikleců intenzifikace zemědělství, která vedla k přeměně stepí a prérií v zemědělskou půdu a k eutrofizaci půdy. Větší koncentrace dusíku a fosforu se přitom považují jako pro koniklece limitující (Jiras et al. 2010) a zároveň způsobují zarůstání jejich lokalit. Zemědělství navíc přestalo využívat mnoho ploch ke kosení a pasení, což se z velké míry dotklo i lokalit konikleců. Koniklece přitom nejsou schopny uspět v konkurenci s jinými druhy, pokud lokalita není disturbována (Walker et Pinches 2011).

Další ohrožení již snížených populací konikleců způsobuje zástavba, intenzivní turistika, přílišné spásání a otrhávání a vyrývání rostlin, nebo jejich přílišné spásání (Kubát 1997). Koniklece může ohrožovat i nedostatkem opylovačů, neboť mezi jejich hlavní opylovače patří včely a čmeláci, jejichž množství v krajině se v poslední době také snižuje (Barcalová 2014; Torvik et al. 1998). Koniklece jsou ale také napadány specifickými parazity např. bejlmorkou obecnou (*Dasineura pulsatillae*) nebo rzí koniklecovou *Puccinia pulsatillae* (Wennstrom et Ericsson 1991) a požírány divokými zvířaty, což může být problémem, pokud jsou populace rostlin nízké a populace živočichů přemnožené (Juskiewicz-Swaczyna 2010).

Prudké snižování populací dokládají například situace *Pulsatilla grandis*, *Pulsatilla vulgaris*, *Pulsatilla vernalis*, ale i *P. patens* a *P. pratensis* a dalších. *Pulsatilla vulgaris* má snižující se populace v Německu (Hensen et al. 2004) i Anglii, kde se počet lokalit snížil od

roku 1750 do roku 1960 o 100 a od roku 1968 o dalších 16 (Walker et Pinches 2011). Populace *Pulsatilla vernalis* se zmenšují v České republice (Žlebčík et Bylinský 2009), Německu (Betz et al. 2013), Polsku (Grzyl et al. 2013) i Rusku a dalších zemích. Podobná situace panuje i u druhu *P. pratensis* a *P. patens*, které mají problémy také ve svých celých areálech.

Kvůli současné situaci jsou koniklece na mnoha místech považované za ohrožené, často i chráněné zákonem. Červený seznam IUCN (2012) považuje populace čtyř druhů konikleců za snižující se (*P. grandis*, *P. slavica*, *P. vernalis*, *P. halleri*). Tři druhy konikleců se objevují také v Bernské úmluvě (1979), a to *P. patens*, *P. slavica* a *P. grandis*.

V Červené knize Ruska se objevují tři druhy konikleců (*P. pratensis*, *P. vulgaris*, *P. vernalis*), které jsou i chráněné (Lliahenko et Iliashenko 2000). Slovensko chrání zákonem 6 druhů konikleců, Německo všechny druhy konikleců, Ukrajina 4 druhy, Finsko chrání všechny původní druhy včetně kříženců.

U nás je zákonem chráněno všech pět našich původních zástupců (Zákon č. 114/1992 Sb., o ochraně přírody a krajiny). Dva patří mezi kriticky ohrožené (*P. patens* a *P. vernalis*), dva mezi silně ohrožené (*P. grandis* a *P. pratensis*) a jeden mezi ohrožené (*P. scherfelii*) (Grulich 2012).

V rámci ochrany druhů rodu koniklec je na mnoha lokalitách prováděna managementová opatření. Kromě prostého oplocení lokalit se lokality zbavují nadměrného výskytu zarůstání především extenzivním spásáním a vypalováním, přičemž vypalování dobře funguje v borovicových lesích i v travnatých společenstvech (Kalamees et al. 2011; Röder et Kiehl 2006).

U velmi malých populací se často také přistupuje k reintrodukci většinou mladých rostlin, někdy semenáčků nebo semen. Reintrodukce má většinou dobré výsledky, protože vývoj konikleců je nejohroženější ve stádiu semen a semenáčků (Lorber 1997; Šedivá et Žlebčík 2012; Walker et Pinches 2011).

## 2.3 Mikroevoluční procesy

Procesy mikroevoce probíhají typicky na nižší jak druhové úrovni a řadíme mezi ně například mutace, selekce, genový tok a genetický drift, hybridizace a polyploidizace. Mikroevoluční procesy mohou vést ke vzniku a zániku druhu (Flegr 2006).

### 2.3.1 Polyploidizace

Polyploidizace je proces, při kterém dojde ke zvýšení počtu sádek chromosomů na více jak dvě. Mezi polyploidy se tradičně rozlišují autopolyploidi a alopolyploidi. Autopolyploidi jsou organismy, u nichž je duplikován genom vlastního druhu. Nejpravděpodobnějším vznikem autopolyploida je splynutí redukované a neredukované gamety za vzniku triploidního jedince. Vznik triploidů může umožnit vznik stabilnějších tetraploidů (tzv. triploidní most), kdy triploid produkuje neredukované (triploidní) gamety, které splynou s redukovanou gametou diploida a vzniká tetraploid (Rieseberg 2007).

Alopolyploidi naopak vznikají hybridizací různých rodičovských druhů a následnou polyploidizací (Leitch et Leitch 2011).

U rostlin je polyploidie častá, vyskytuje se velmi často u kaprad'orostů (až 95% druhů), téměř vůbec u nahosemenných (u méně jak 5% druhů), často se naopak vyskytuje u krytosemenných (nejméně u 70% druhů, nejspíše však polyploidizací neprošel pouze bazální druh *Amborella trichopoda*; Suda 2009).

Polyploidizace může v rámci jednoho taxonu proběhnout vícekrát a může tak vzniknout několik různých cytotypů, které se odlišují nejen geneticky, ale i morfologicky a ekologicky a může docházet i k jejich vzájemnému křížení (Rieseberg 2007).

Polyploidizace má velký význam pro jednotlivé druhy, ale i pro celou evoluci. Polyploidizace (především alopolyploidizace) umožňuje díky většímu množství genů lépe odolávat inbrední depresi a lépe se přizpůsobovat různým ekologickým podmínkám. Často vede ke speciaci a napomáhá i obrovským evolučním procesům jako jsou radiace, například radiaci dvouděložných (Otto et Whitton 2000).

Polyploidizace, ale také nepřímo ovlivňuje interakce organismů, například interakce rostlin a hmyzu, včetně vztahů opylovačů a opylovaných (Thompson et al 1997).

### 2.3.2 Mezdruhová hybridizace

Hybridizace je společná reprodukce dvou druhů organismů, při které vznikají hybridi (kříženci).

Hybridizace je poměrně častý evoluční mechanismus, jehož význam na úrovni jedinců je zanedbatelný (výskyt je nižší jak u 0,1% jedinců za generaci v populaci typického druhu), ale je poměrně vysoký na úrovni druhů. Hybridizace je totiž i součástí dalšího evolučního mechanismu, a to alopolyploidizace, při kterém dochází ke křížení a následnému znásobení genomu.

Hybridizace může udržovat genový tok mezi druhy, může významně ovlivňovat rodičovské druhy, ale může také vést ke speciaci druhu nového (Mallet 2007).

K hybridizaci může dojít pouze v případě, že reprodukční bariéry mezi druhy jsou buď velmi slabé, nebo vůbec neexistují (Briggs et Walters 2001).

Vlastnosti hybridů jako je jejich fitness, fertilita i vzhled přitom do velké míry určují genomové přestavby pobíhající okamžitě po hybridizaci. Jedná se především o rozsáhlé mutace, ztrátu některých genů, utišení genů, změny v expresi genů, proliferaci retrotranspozonů (Rieseberg 2007).

Tyto změny genomu mají vliv i na jeho velikost, a proto má většina hybridů jinou (intermediární) velikost genomu než jejich rodičovské druhy (Lysák 2009).

Fitness a fertilita hybridů jsou často popisovány jako výrazně nižší než jejich rodičů. Mnoho hybridů je dokonce považovaných za sterilní.

Snížená fertilita a fertilita jsou přímo způsobené tzv. postzygotickými bariérami, tedy genomovými přestavbami, které se projevují, jako jsou poruchami při segregaci chromozómů během miózy, nekompatibilita na úrovni genů se projevuje zánikem spolupráce genů, která se odehrávala u rodičovských druhů, a to kvůli rozpadu komplexů genů. Uvedené nekompatibility se mohou projevit až v několikáté generaci kříženců (Flegr 2006).

Uváděná sterilita hybridů však může být úplná kryptická a i s velmi nízkou fertilitou se hybridi mohou rozmnožovat (např. křížení *Helianthus annuus* (slunečnice roční) a *H. petiolaris* (slunečnice řapíkatá), kterým vzniká několik generací hybridů, přestože pyl F1 generace je fertilní pouze ze 14% a semena F2 generace dosahují 1-2% množství semen rodičovských druhů) (Heiser et al. 1969).

Hybridů se mohou rozmnožovat mezi sebou, anebo s rodičovskými druhy. Pokud se hybridi rozmnožují mezi sebou a dojde ke vzniku reprodukčních bariér mezi nimi a rodičovskými druhy, proběhne hybridní speciace (Rieseberg 2007).

Speciace i bariéry probíhají ve dvou úrovních, ekologické a genetické, které mohou probíhat současně i jednotlivě. Ekologickou speciací se hybridi specializují na ekologické podmínky, obsazují niku, která je volná, nebo která je i částečně obsazená (nejčastěji jedním z rodičovských druhů), ale ve které uspějí díky svým vlastnostem v kompetici. Genetickou speciací vzniká velké množství různě významných genetických změn (mutací) chromozómů i genů, včetně polyploidizace.

Pokud se hybridi kříží zpětně se svými rodičovskými druhy, dochází k tzv. zpětnému křížení, postupným zpětným křížením dochází k introgresi (vzájemnému vnášení genů do

genomů; Rieseberg 2007). Introgresí pak vzniká několik typů hybridů (např. v rodech *Sorbus*, *Hieracium*, *Diphasiastrum*; Hanušová et al. 2014; Urfus 2006; Vít 2006).

### 2.3.3 Ohrožení rodičovských druhů způsobené hybridizací

Zásadní negativní vliv může mít na rodičovské populace intenzivní genový tok způsobený introgresí. Genový tok může vést k narušení genotypů druhů a postupně až k potlačení jednoho z nich a jeho vymizení, nebo k fúzi genotypů za snížení genetické diverzity vymizením některých málo častých částí genomu (Eroukhmanoff 2013).

Hybridi mají dále na rodičovské druhy negativní vliv, protože dochází ke vzájemné konkurenci, která vyčerpává rodičovské populace (Rhymer et Simberloff 1996).

Rodičovské populace, ale také ohrožuje jejich reprodukce, která vede ke vzniku hybridů jakéhokoli řádu, kvůli níž vzniká méně potomků vlastního druhu (Levin 1996).

Negativní vlivy hybridizace (stejně jako jiných evolučních jevů) se zvyšují, pokud jsou rodičovské populace, nebo jedna z nich, malé. Hybridizace se tak může stát nebezpečím i u druhů, u kterých probíhá již dlouhou dobu, ale v současnosti jsou jejich populace v důsledku vlivu člověka snižované.

Silně negativní vliv mívá hybridizace také, pokud probíhá nově mezi druhy, které byly geograficky odděleny a setkaly se jen díky činnosti člověka, jedná se o narušení stanovišť i šíření invazivních druhů, případ křížení *Geum rivale* (kuklík potoční) a *G. urbanum* (kuklík městský), nebo *Typha latifolia* (orobinec širokolistý) a *T. angustifolia* (orobinec úzkolistý) (Morgan et al. 2009).

## 2.4 Velikost genomu

Velikost genomu vyjadřuje množství jaderné DNA organismu.

Velikosti genomu je stálá a dědičná, a tak charakteristická pro určitý druh organismu (Gregory 2005). Velikost genomu však není korelována s umístěním organismu ve fylogenetickém stromu (označováno jako paradox C-hodnoty). Velikost genomu totiž nevyjadřuje pouze množství přepisovaných genů, ale zvětšuje se i díky nepřepisovaným sekvencím (repetitivní sekvence, transposony, satelity, introny, pseudogeny), nebo díky polyploidizace (Bennett and Leitch 2005).

Velikost genomu se značí jako C-hodnota (v angličtině C-value, C je zkratkou pro výraz constant). Monoploidní počet chromosomů je značen jako Cx-hodnota. Množství DNA se vyjadřuje v pikogramech (pg) nebo počtem párů bází (Greilhuber et al. 2005).

Metodou, která spolehlivě analyzuje velikost genomu je průtoková cytometrie (FCM).

Rozdíly mezi velikostí genomu jsou u různých taxonomických skupin, především u rostlin, velké, a tak je velikost genomu využívána jako taxonomický marker a slouží k rozlišení druhů, popřípadě kříženců (Loureiro 2010).

## 2.5 Mikroevoluční procesy v rodu *Pulsatilla*

V rodu *Pulsatilla* se mikroevoluční procesy uplatňují ve vysoké míře.

### 2.5.1 Polyploidizace

Koniklece mají základní počet chromozómů  $x = 8$ , diploidní počet chromozómů je 16. Polyploidizace je popisována u několika druhů, a to pouze tetraploidizace. Nejasná je situace u druhu *Pulsatilla zimmermannii* (východopanonský endemit), u kterého je udáván počet chromozómů 26 (Skalický 1997). Všichni naši zástupci jsou diploidní až na druh *Pulsatilla grandis* a na u nás nepůvodní druh *Pulsatilla vulgaris*, které jsou tetraploidní (Javůrková-Jarolímová et Měsíček 1992).

### 2.5.2 Hybridizace

Hybridizace je v rodu *Pulsatilla* velmi častým jevem. Situaci dobře dokládají počty kříženců popisovaných v Evropě, ve střední Evropě, na Slovensku a v České republice. V Evropě je totiž popisováno 9 druhů a 13 kříženců (Tab. 1), ve střední Evropě 9 druhů a 11 kříženců (Hegi et Weber 1975), v České republice 6 druhů a 4 kříženci (*Pulsatilla* × *hackelii* Pohl, *Pulsatilla* × *celakovskyana* Domin, *Pulsatilla* × *intermedia* Lsch., *Pulsatilla* × *mixta* Halácsy; Skalický 1997), na Slovensku 9 druhů, 4 kříženci a 1 kříženec se předpokládá (Golíašová 1982).

Tab. 1: Popsání hybridů rodu *Pulsatilla* v Evropě (Aichele et Schwagler 1957; Hegi et Weber 1975; Skalický 1997).

\* jsou označeni hybridy vyskytující se v naší květeně (Krejčová 2011)

hybrid	rodiče
<i>Pulsatilla</i> × <i>hackelii</i> Pohl*	<i>Pulsatilla patens</i> <i>Pulsatilla pratensis</i> subsp. <i>pratensis</i>
<i>Pulsatilla</i> × <i>intermedia</i> Lsch. *	<i>Pulsatilla patens</i> <i>Pulsatilla vernalis</i>
<i>Pulsatilla</i> × <i>valentiana</i> Wagner	<i>Pulsatilla patens</i> <i>Pulsatilla grandis</i>
<i>Pulsatilla</i> × <i>celakovskyana</i> Domin*	<i>Pulsatilla pratensis</i> subsp. <i>bohemica</i> <i>Pulsatilla vernalis</i>
<i>Pulsatilla</i> × <i>gayeri</i> Smk.	<i>Pulsatilla montana</i> <i>Pulsatilla patens</i>
<i>Pulsatilla</i> × <i>bolzanensis</i> Murr.	<i>Pulsatilla montana</i> <i>Pulsatilla vernalis</i>
<i>Pulsatilla</i> × <i>ochroleuca</i> (Brügg.) Torre et Sarnthem	<i>Pulsatilla alpina</i> subsp. <i>alpina</i> <i>Pulsatilla apifolia</i>
<i>Pulsatilla</i> × <i>affinis</i> Lasch	<i>Pulsatilla vulgaris</i> <i>Pulsatilla pratensis</i> subsp. <i>pratensis</i>
<i>Pulsatilla</i> × <i>mixta</i> Halácsy*	<i>Pulsatilla grandis</i> <i>Pulsatilla pratensis</i> subsp. <i>bohemica</i>
<i>Pulsatilla</i> × <i>holubyana</i> Domin	<i>Pulsatilla grandis</i> <i>Pulsatilla slavica</i>
<i>Pulsatilla</i> × <i>propinqua</i> Lasch	<i>Pulsatilla vulgaris</i> <i>Pulsatilla vernalis</i>
<i>Pulsatilla</i> × <i>weberi</i> (Widder) Janchen	<i>Pulsatilla halleri</i> subsp. <i>styarica</i> <i>Pulsatilla pratensis</i> subsp. <i>nigricans</i> ?
<i>Anemone</i> × <i>emiliana</i> Wolf	<i>Pulsatilla halleri</i> subsp. <i>halleri</i> <i>Pulsatilla vernalis</i>

Vysoká frekvence hybridizace svědčí o tom, že reprodukční bariéry mezi jednotlivými druhy konikleců jsou slabé, nebo neexistují (Krause 1958).

Slabé nebo neexistující reprodukční bariéry potvrzují předpoklady, že druhy v rodu koniklec jsou evolučně mladými druhy, které se na pozadí změn posledních dob ledových a

meziledových opakovaně stýkaly, docházelo mezi nimi ke genovému toku a ještě stále prochází rychlým vývojem (Briggs et Walters 2001).

V hybridizaci v rodu *Pulsatilla* můžeme vysledovat několik pravidel. Nejvíce křížení probíhá mezi druhy homoploidními, konkrétně diploidními. Křížení mezi druhy tetraploidními je uváděno v přirozených podmínkách jako velmi málo časté, v experimentálních podmínkách jako málo časté a není jasné, zda uvedený rozpor ve frekvenci hybridizace se skutečně vyskytuje nebo je to pouze artefakt pozorování.

Hybridizace mezi druhy heteroploidními je sice popisována, ale pouze sporadicky a vzhledem k očekávanému triploidnímu potomstvu se obecně považuje za výjimečnou, přesto byla z experimentů popsána, a to konkrétně hybridizace diploidního druhu *P. patens* a tetraploidního druhu *P. vulgaris* (Lindell 1998).

Kromě primární hybridizace je v rodu koniklec také velmi často popisována zpětná hybridizace a introgresivní hybridizace (Hegi et Weber 1975).

Introgresivní hybridizace se přitom uplatňuje v hybridních zónách, které jsou u rodu koniklec také popisovány (například mezi druhy *P. halleri* subsp. *slavica* a *P. grandis* (Zimmermann 1964).

## **2.6 Pulsatilla patens (L.) Mill. (koniklec otevřený)**

Používaná synonyma jsou *Anemone patens* L., *Pulsatilla latifolia* Rupr., *P. teklae* Zamels, *P. bauhini* Tausch (Aichele et Schwagler 1957; Skalický 1997).

V ČR roste pouze poddruh subsp. *patens*, koniklec otevřený pravý.

### **2.6.1 Morfologický popis**

Koniklec otevřený má silný vystoupavý oddenek tmavě hnědé barvy. Oddenek mívá několik pupenů. Listy jsou v přízemní růžici v počtu 2-5. Listy se objevují až během květu a vyvinuté jsou až v době odkvétání. Listy nepřezimují, přes zimu usychají. Čepel listu je stejně široká jako dlouhá a trojsečná nebo trojčetná, lístky a úkrojky jsou přisedlé, dlanitodílné nebo dlanitosečné. Úkrojky lístků jsou široké v průměru 0,8 cm a jejich počet je 15-30 (Aichele et Schwegler 1957).

Délka stonku v květu je 5-15 cm, po odkvětu se stonek prodlužuje až do délky 50 cm. Pod květem se nachází brakteol, který se prodlužováním stonku (a potažmo květní stopky) posouvá směrem ke spodní části stonku. Brakteol vzniká srůstem 3 listenů a tvoří ho 14-20



úkrojků o šířce asi 0,1 cm. Květy jsou vzpřímené, v noci a za deště se zavírají a sklápějí. Okvětní lístky jsou delší jak širší (délka je 2,5-3,6 cm a šířka 0,7-1,7 cm), jejich vrchol je tupý nebo špičatý (Goliasová 1982). Květy jsou velké, jejich průměr bývá 5,5 až 8,5 cm. Barva květu se pohybuje od světle modré až po světle fialovou. Vnitřní tyčinky bývají 2-3 krát kratší než okvětní lístky a mají žlutou barvu. Čnělky jsou víceméně rovné. Přívěšek u nažek bývá obvykle dlouhý 3-4,5 cm. Koniklec otevřený kvete koncem března až začátkem května, začíná kvést asi o 14 dnů dříve než koniklec luční (Skalický 1997).

Variabilita druhu je poměrně malá, výjimečně se vyskytují rostliny bělokvěté (*f. lactiflora* Domin), olysalé (*f. glabrescens* Preuss) nebo plnokvěté (Skalický 1997).

## 2.6.2 Karyologie

Koniklec otevřený je diploidní druh,  $2n=16$  (Javůrková-Jarolímová et Měsíček 1992).

## 2.6.3 Taxonomické členění

V rámci druhu jsou rozlišovány tři až čtyři poddruhy, které se liší především v počtu úkrojků listů, v barvě květů a v geografickém rozšíření (Aichele et Schwagler 1957; Hegi et Weber 1975; Moore 1964).

### Subsp. *patens* (L.) Mill.

Synonymum názvu je subsp. *latifolia* (Rupr.) Zämsels.

Popis: Květy jsou modro-fialové, výjimečně fialové nebo bílé. Listy mají nízký počet úkrojků, pouze 15-30. Úkrojky jsou široké 0,5-1,2 cm. Listy vyrůstají v době květu. Listeny v brakteolu srostlé do délky asi 1 cm.

Ekologie: Suché trávníky slunných expozic a reliktní bory.

Výskyt: Pobaltské státy, evropská část Ruska, Bělorusko, Ukrajina, Polsko, Finsko, Švédsko, Maďarsko, Rumunsko, Bulharsko, ČR, Německo, Slovensko (Skalický 1997).

### Subsp. *teklae* Zämsels

Někdy je tento poddruh řazen do poddruhu *patens*.

Popis: Květy jsou pouze modro-fialové. Listy mají hodně úkrojků (30-90), které jsou krátké a široké pouze 0,4 cm.

Ekologie: Suché trávníky a reliktní bory.

Výskyt: Polsko, Litva, Lotyšsko (Aichele et Schwagler 1957).

#### Subsp. multifida (Pritz.) Zämels

Synonymem je subsp. wolgangiana Rupr., Pulsatilla hirsutissima (Pursh) Britton, P. ludoviciana (Nutt.) A. Keller.

Popis: Barva květů je modro-fialová, výjimečně růžová-bílá. Listy mají hodně úkrojků (30-80), které jsou úzké a kopinaté, široké jen asi 0,4 cm. Na rozdíl od ostatních poddruhů se listy objevují před květy. Listeny v brakteolu srůstají do délky 0,75 cm. Je symbolem kanadské provincie Manitoba a amerického státu Jižní Dakota.

Ekologie: Stepí, skály, říční údolí, louky, sutě, stepní křoviska, tundra.

Výskyt: Rusko – Sibiř, Mongolsko, Spojené státy americké, Kanada (Borodina-Grabovskaja et al. 2007; Whittemore 1997).

#### Subsp. flavescens (Zucc.) Zämels

Synonymem je subsp. asiatica (Zucc.) Krylov.

Popis: Výjimečná je barva květů u tohoto poddruhu, jež je žlutá a pouze zřídka světle fialová. Listy mají střední počet úkrojků (18-40), které jsou široké jen 0,3 cm. Listeny v brakteolu srůstají asi v délce 1,3 cm.

Ekologie: Stepí, louky, skály, březové a borovicové lesy.

Výskyt: Rusko- Sibiř (Borodina-Grabovskaja et al. 2007).

### **2.6.4 Výskyt v České republice**

Koniklec otevřený se v České republice vyskytuje v Českém termofytiku a Českomoravském mezofytiku v kolinním a suprakolinním stupni, historicky se konkrétní lokality nachází v: Doupovských horách, Českém středohoří (Lounsko-labském, Milešovském a Lovečském středohoří), Podkrušnohorské pánvi, středním Povltaví, dolním Povltaví, Dolním Pojizeří, Ralsko-bezděžské tabuli a Českém krase (Kubát 1997; Skalický 1997).

### **2.6.5 Ohrožení a ochrana**

Populace koniklece otevřeného se snižují v celém areálu druhu u všech jeho poddruhů. Výrazné snižování populací je popisováno z České republiky, Německa, Polska, Finska, Estonska, ale také států Severní Ameriky (Aiken et al. 2007; Pilt et al. 2002; Uotila 1996).

V České republice za posledních několik desítek let klesl počet lokalit o přibližně 90% (Grulich 2012), vymizely především menší populace, větší populace se pak rapidně zmenšily (Kubát 1997; Turoňová et al. 2012), druh je považován za druh kriticky ohrožený (C1t). V

současnosti se připravuje vyhlášení záchranného programu pro tento druh (ústní sdělení D. Turoňová). V Německu zbývá poslední lokalita koniklece otevřeného, jejíž početnost dále klesá (Röder et Kiehl 2006), v Polsku došlo ke zmizení přibližně tří čtvrtin lokalit (Juśkiewicz-Swaczyna 2010), v Estonku a Finsku došlo také ke snížení počtu lokalit o desítky a ke snížení populací i na existujících lokalitách (Pilt et Kuk 2002; Uotila 1996). V Severní Americe i Rusku došlo k významnému snížení populací zejména kvůli přeměně stepí na zemědělskou půdu (Aiken et al. 2007).

Kvůli snižování populací je druh různými způsoby chráněn. Mezinárodně je druh chráněn Bernskou úmluvou (Úmluva o ochraně evropských planě rostoucích rostlin, volně žijících živočichů a přírodních stanovišť z 19. září 1979, příloha 1) a je i uveden ve směrnici o stanovištích (Směrnice Rady č. 92/43/EHS z 21. května 1992 o ochraně přírodních stanovišť, volně žijících živočichů a planě rostoucích rostlin, příloha 2), podle níž se vyhláší lokality Natura 2000. Zákonem je koniklec otevřený chráněn v České republice, na Slovensku, Polsku, Finsku a Estonsku.

Vzhledem k situaci druhu se provádí různé typy managementu, jako u všech konikleců se jedná především o ochranu lokalit před úplným zničením (zástavbou) a zabránění jejich zarůstání lokality (pastvou, sečením a vypalováním). V České republice se provádí především sečení (Humnický vrch, Havraň, Krásná Lípa), pastva (Holý vrch), odstraňování keřů (lokality u obce Pastviny, lokalita u obce Líšnice), strhávání drnu (Humnický vrch; Turoňová et al. 2012). Pokud se lokalita nachází blízko lidským sídlům a rostliny jsou ohroženy vyrýpáváním, bývají lokality oplocovány a v době květu hlídány (Krásná Lípa). Oplocení se však používá i jako ochrana proti zvěři (Líšnice). Na lokalitách s velmi sníženou početností koniklece otevřeného se uvažuje o reintrodukci, která se v současnosti provádí na lokalitě u obce Bělé pod Bezdězem (dosazování několikaletých rostlin) a na lokalitě Krásná Lípa (vysévání semena, dosazování různě starých rostlin; vlastní zjištění).

## **2.7 Pulsatilla pratensis (L.) Mill. (koniklec luční)**

Synonyma: *Pulsatilla nigricans* Störck, *Anemone pratensis* L., *Pulsatilla zimmermannii* Soó, *Pulsatilla montana* Reichenb., *Anemone intermedia* Schultes (Aichele et Schwegler 1957; Skalický 1997).

V naší republice se vyskytuje pouze poddruh subsp. *bohemica*, koniklec luční český.

### 2.7.1 Morfologický popis

Koniklec luční má černý oddenek, který má několik pupenů překrytých vejčitými šupinami. Většina orgánů rostliny je pokryta silným oděním bílé barvy.

Listy jsou v době květu již hodně vyvinuté, vyrůstají z přízemní růžice v počtu 3-5. Jejich řapíky jsou dlouhé, často tak dlouhé jako čepele, zakřivené, odstálé nebo šikmé. Čepel je vejčitá až vejčitě kopinatá. V mládí má čepel asi 30 úkrojků, později je jednou až dvakrát lichozpeřená s 3-5 jařmy s listky, popřípadě lístečky jednou až dvakrát peřenosečnými. Úkrojků je velké množství (100-200), jsou podlouhlé tvaru, špičaté, široké 0,1-0,3 cm. Listy jsou pokryty chlupy, často nafialovělé (díky přítomnosti antokyanů působících jako obrana proti UV záření). Listy nepřezimují a přes zimu usychají (Aichele et Schwagler 1957; Hegi et Weber 1975). Výška stonku za květu je 8-15 cm, stonek se však dále prodlužuje až do výšky 45 cm, prodlužuje se i květní stopka. Pod květem je brakteol vzniklý srůstem 3 listenů, který tvoří 4-31 úkrojků. Úkrojky jsou dlouhé 0,9-2,8 cm, široké až 0,6 cm. Úkrojky listenů a listů jsou téměř stejně široké.

Květy jsou nící (tedy skloněné dolů). Jsou nejprve válcovitého, později až zvonkovitého tvaru (Kalamees et al. 2012). Okvětní lístky jsou 1,5-3 cm dlouhé, 0,7-1,2 cm široké, eliptického tvaru. Tři vnější lístky bývají kratší než tři vnitřní. Jejich vrcholy se ohýbají směrem ven. Průměr květů je 3-4 cm. Barva je od tmavě fialové po tmavě červenou až světle fialovou, vzácně až žlutou a bílou. Nažky jsou chlupaté v souplodí po několika desítkách, jejich přívěšky jsou dlouhé 4-5 cm. Koniklec luční kvete v období od března do května (Skalický 1997).

Na našem území byly popsány dva morfotypy poddruhu subsp. *bohemica*, které jsou klinální, postupně tedy přechází jeden ve druhý.

První typ roste v Čechách, má válcovité květy, které jsou silně nící po celou dobu květu. Brakteol je uzavřený, má většinou pouze 20 úkrojků.

Druhý morfotyp roste více na východě, na jižní Moravě, u Vídně a u Bratislavy. Jeho květy jsou sice nící, ale pouze mírně. Brakteoly jsou otevřenější a mají okolo 26 úkrojků. Mezi variety *P. pratensis* se řadí varieta *albida* (Domin) Skalický se světle fialovými, bílými, žlutými nebo růžovými květy a menšími listy, popsána byla z okolí Bělé pod Bezdězem. Další varietou, možná totožnou s var. *albida*, je var. *ochroleuca* Tausch, která má světle fialové, bílé až nazelenalé okvětní lístky a vyskytuje se například na Humnickém vrchu (Skalický 1997).

### 2.7.2 Karyologie

Druh je diploidní,  $2n=16$  (Javůrková-Jarolímová et Měsíček 1992), údaj o tetraploidním počtu chromozómů ( $2n=32$ ) se objevuje v několika starších publikacích a při nejnovějších průzkumech nebyl potvrzen (Aichele et Schwegler 1957).

### 2.7.3 Taxonomické členění

Pojetí poddruhů se u jednotlivých autorů liší. Jejich rozlišení probíhá na základě odlišnosti geografického rozšíření a fenotypu. Avšak morfologické popisy poddruhů se často překrývají (subsp. *bohemica*, *nigricans*, *pratensis*). Jak navíc zjistila studie Szentpéteri et al. (2007) rostliny s charakteristickými fenotypovými znaky poddruhů se vyskytují i mimo své areály v areálech jiného poddruhu, navíc často na společných lokalitách (příkladem jsou rostliny se žlutými květy (typický znak subsp. *hungarica*, které se vyskytují v Polsku v areálu poddruhu *bohemica*.

#### Subsp. *bohemica* Skalický

Tento poddruh je endemitem střední Evropy.

Popis: Listy mají mnoho úkrojků. Květy jsou nící, jejich tvar je válcovitý, postupem času až zvonkovitý. Barva květů je tmavě fialová až světle fialová, zřídka žlutá nebo bílá. Výskyt: Střední Evropa (Německo, Rakousko, ČR, SR, Polsko, Maďarsko; Skalický 1997).

#### Subsp. *hungarica* Soó

Jedná se o endemit Slovenska a Maďarska.

Popis: Květy jsou nící, mají zvonkovitý tvar, ale jsou uzavřené, v průměru mají 2-3 cm. Barva květů je světlá, světle fialová, žlutá až nazelenalá.

Výskyt: Slovensko, Maďarsko (Aichele et Schwegler 1957).

#### Subsp. *nigricans* (Störck) Zámels

Někdy do tohoto poddruhu řazen subsp. *bohemica*, někdy ještě vyčleňován poddruh subsp. *ucrainica* Ugr.

Popis: Květy jsou nící, zvonkovitého, ale široce otevřeného tvaru. Mají výrazně tmavou barvu, víceméně černou, někdy tmavě fialovou.

Výskyt: Ukrajina, Rusko (Hegi et Weber 1975).

#### Subsp. *pratensis* Pritz.

Popis: Celkově podobný subsp. *bohemica*. Květy jsou nící, mají zvonkovitý tvar, ale jsou uzavřené. Mají světle fialovou až fialovou barvu, výjimečně mohou být žluté nebo růžové.

Výskyt: Pobaltí (Moore 1964).

### **2.7.4 Výskyt v České republice**

*Pulsatilla pratensis* roste v České republice v termofytiku a přilehlém mezofytiku, v planárním až suprakolinním stupni, a to ve dvou areálech: české (severní, střední a východní Čechy) a moravské (jižní Morava).

Historicky se lokality nachází:

V Čechách – Doupovské hory, Střední Poohří, Podkrušnohorská pánev, České středohoří (Lounsko-labské, Milešovské, Lovečské středohoří), Středočeská tabule, Český kras, Dolní Povltaví, Střední Povltaví, Pražská plošina, Dolní Pojizeří, pardubické Polabí, Rakovnická kotlina, Křivoklátsko, Příbramsko, Podbrdsko, Ralsko-bezděžská tabule, Železné hory, Českodubská pahorkatina, Kutnohorská pahorkatina, Na Moravě – Znojemsko-brněnská pahorkatina, Jihomoravské úvaly, Jihomoravská pahorkatina, moravské podhoří Vysočiny (Kubát 1997; Skalický 1997).

### **2.7.5 Ohrožení a ochrana**

Populace druhu *Pulsatilla pratensis* se také snižují v celém jeho areálu. V České republice se populace radikálně snížila, ale momentálně mu nehrozí vyhynutí. Je považován za silně ohrožený taxon (C2b) a je u nás stejně jako ostatní koniklece chráněný zákonem. Populace koniklece lučního se snížily i na Slovensku (zákon č. 543/2002 Z. z.), v Polsku (zákon o ochraně přírody Dz.U. Nr 92 poz. 880), Rumunsku (vyhláška č. 57 z 20. 6. 2007) a Ukrajině (ukrajinský zákon No 2456-XII) a Rusku (ruský zákon 1996, No 9, Art. 808). Ve všech těchto zemích je druh také chráněn zákonem.

Management lokalit se i u koniklece lučního snaží hlavně zabránit jejich zarůstání. Provádí se pasení (vrch Čičov), sečení (Humnický vrch), odstraňování keřů a strhávání drnu. Momentálně není v České republice prováděna reintrodukce (vlastní zjištění).

## 2.8 Hybridizace druhů *Pulsatilla patens* a *Pulsatilla pratensis*

Hybridizace mezi druhy *P. patens* a *P. pratensis* je vůbec nejčastěji popisovanou hybridizací v rodu *Pulsatilla* v Evropě. Hybrid vzniklý tímto křížením se nazývá *Pulsatilla* × *hackelii* Pohl. Synonym tohoto názvu je několik, např. *Pulsatilla* × *hybrida* Mikan, *Pulsatilla* × *bohémica* Pritz., *Pulsatilla* × *borosiana* J. Wagner (Moore 1964).

*Pulsatilla* × *hackelii* byl Johannem Emanuele Baptistem Pohlem popsán v roce 1815 z vrchu Hradiště u obce Hlinná u Litoměřic (Steudel 1821). Typová položka nebyla nalezena, ani v herbáři PřF UK, ani v herbáři Národního muzea, ani v herbáři Amsterdamské univerzity (Universiteit van Amsterdam), který byl přesunut do Univerzity v Leidenu (Universiteit Leden), podle informace F. Boumana z Amsterdamské univerzity se pravděpodobně ztratila spolu s většinou sbírky J. E. Pohla, která byla Amsterdamskou univerzitou zakoupena.

Hybridizace mezi druhy *P. patens* a *P. pratensis* může stejně jako jiné hybridizace ohrožovat rodičovské druhy. A to především vyčerpáváním reprodukčních možností rodičů hybridizací, oslabováním rodičovských populací jejich kompeticí s hybridní populací (což by bylo umocňováno již probíhajícím snižováním populací rodičovských druhů způsobovaným jinými důvody). Pokud by hybridy byli schopni reprodukce, byly by rodičovské druhy ohrožovány i introgresí, genovým tokem a potlačováním genomu (viz kapitola Ohrožení rodičovských druhů způsobené hybridizací).

### 2.8.1 Morfologie hybrida *Pulsatilla* × *hackelii*

Fenotyp tohoto křížence je dle popisů intermediární vzhledem k fenotypu jeho rodičovských druhů. V dalších charakteristikách se popisy hodně liší, navíc je popisována vysoká variabilita kříženců (Čelakovský 1865).

Listy hybrida jsou popisovány jako intermediární, přičemž Holub (1978) tvrdí, že jsou listy hybrida podobnější listům druhu *P. patens*.

Holub (1978) popisuje listy jako přibližně stejně široké jako dlouhé a dlanitě dělené do širokých úkrojků. Podstatným rozdílem oproti druhu *P. patens* je podle něj růst jařem opravdu blízko sebe a umístění posledního jařma blízko vrcholu listu.

Skalický (1997) naopak tvrdí, že jsou listy hybrida podobnější druhu *P. pratensis*, ale mají kratší vřeteno mezi jařmy lístků.

Květy jsou dle Skalického (1997) mírně nící. Jejich barvu a velikost popisují autoři jako intermediární červenofialovou (Čelakovský 1865; Skalický 1997).

### 2.8.2 Karyologie *Pulsatilla* × *hackelii*

U hybrida *Pulsatilla* × *hackelii* se počet somatických chromosomů považuje za diploidní ( $2n=16$ ) stejně jako u jeho rodičovských druhů. Tomuto počtu nasvědčuje i intermediární velikost genomu *Pulsatilla* × *hackelii*.

### 2.8.3 Fertilita *Pulsatilla* × *hackelii*

*Pulsatilla* × *hackelii* je většinou považován za sterilního hybrida (Skalický 1997). Pouze někteří autoři popisují u těchto hybridů tvorbu květů a semen, která však nejsou schopna vyklíčit (Holub 1978). Pro vznik hybridů se tak předpokládá nutnost neustálého opakování křížení nebo jejich vegetativní množení.

Jsou však popisováni i jedinci, u kterých se předpokládá vznik zpětným křížením a introgresí, jsou rozeznáváni na základě jejich morfologických znaků (Hegi et Weber 1975).

### 2.8.4 Výskyt *Pulsatilla* × *hackelii*

Lokality *Pulsatilla* × *hackelii* jsou popisovány z Čech, Polska, Německa a Slovenska (Goliašová 1982; Moore 1964).

Přičemž konkrétní lokality v České republice jsou (Kubát 1997; Skalický 1997):

České středohoří: (Lounské středohoří - Tobiášův vrch, Třešňovec, Dobřice, Skalka,

Labské středohoří - Hradiště, Kamýk, Hlinná, Holý vrch, Zálezly, Mariánský vrch

Lovečské středohoří – Stříbrníky).

Střední Povltaví: Závist u Zbraslavi.

Doupovské hory: Dubový vrch, Humnický vrch, Prostřední vrch u Kadaně, mezi Malešínem a Jindřichovem.

Ralsko-bezděžská tabule: Bělá pod Bezdězem.

## 2.9 Teoretický úvod k používaným metodám

Cílem této práce bylo s jistotou detekovat hybridní rostliny *P.* × *hackelii*, pro což byla použita analýza velikosti genomu pomocí průtokové cytometrie. Charakteristické morfologické znaky hybrida byly určovány pomocí morfometrických analýz. Fertilita *P.* × *hackelii* byla prověřována analýzou životaschopnosti pylových zrn a analýzou semen.



### 2.9.1 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie (flow cytometry, FCM) je hojně využívaná biologická metoda, jen při výzkumu cévnatých rostlin se cytometrie využívá v otázkách biosystematiky, ekologie a populační biologie (Loureiro et al. 2010).

Průtoková cytometrie je efektivní metodou, která umožňuje simultánně analyzovat různé optické vlastnosti částic.

Pro záznam optických vlastností je nutné, aby byl na molekulu DNA před analýzou navázán fluorochrom (přírodní nebo umělý). Suspenze obsahující analyzované částice je tenkou kapilárou přiváděna do průtokové komůrky, kam je současně pod větším tlakem než suspenze přiváděna unášecí kapalina (roztok soli nebo destilovaná voda), což způsobí uspořádání a zrychlen částic. Částice tak prochází jedna po druhé ohniskem zdroje excitačního záření.

Zdrojem excitačního záření v cytometru může být laser nebo vysokotlaká rtuťová výbojka. Po ozáření fluorochromu světlem vhodné vlnové délky dojde k excitaci, tedy k přechodu elektronů na vyšší energetickou hladinu. Z tohoto nestabilního stavu se ale elektrony vrací zpět na základní energetickou hladinu, při přechodu uvolňují energii světelnou a tepelnou, záření (fluorescence) je sbíráno optickou soustavou (soustava filtrů a zrcadel) a převáděno na elektrické signály pomocí fotonásobičů. Po zesílení signálu a dalších úpravách dochází k jeho digitalizaci. Výstupem měření je histogram zobrazující relativní intenzitu záření jednotlivých analyzovaných částic (Suda 2011).

U cytometrických analýz je udáván i variační koeficient (CV), který určuje variabilitu měření způsobenou různými chybami (přístroje, barvitelnosti), vypočítává se jako podíl směrodatné odchylky a střední pozice píku, jeho velikost je 1 až 10 procent, ale pro udržení kvality měření je jeho maximální velikost 3 procenta (Doležel et al. 2007), výjimku tvoří vzorky s velkým obsahem sekundárních metabolitů nebo s malou velikostí genomu, kde je akceptovatelné CV i 5 respektive 7 procent (Suda 2011).

Mezi výhody průtokové cytometrie patří v první řadě její velká rychlost, která předčí všechny metody s obdobným použitím a umožňuje analyzovat velké množství vzorků. Velmi ceněna je i finanční nenáročnost průtokové cytometrie (Suda 2005). Další předností této metody je její jednoduchost, která umožňuje její široké rozšíření, a její nedestruktivnost, která umožňuje zachovat při životě analyzovaného jedince a je tak vhodná i k výzkumu velmi ohrožených druhů (Doležel et Bartoš 2005).

Mezi nevýhody patří nutnost použití živého a co nejčerstvějšího materiálu, protože jakmile začne vzorek ovadat nebo dokonce hnít, kvalita analýzy se výrazně zhorší, je tedy nutné analyzovat vzorky co nejdříve po sebrání, což výrazně ztěžuje výzkum.

Průtoková cytometrie také špatně rozeznává aneuploidii, B-chromosomy či jinak nápadné chromosomy, což lze rozeznat pomocí roztlačových preparátů (Suda 2005).

Analýzy také ztěžují sekundární metabolity rostlin, jsou to například taniny (*Rosaceae*, *Geraniaceae*), organické kyseliny v listech (*Crassulaceae*), nebo slizovité látky v listech (*Malvaceae*) (Loureiro et al. 2006).

### **2.9.2 Morfometrické analýzy**

Morfometrika je vědou, která poskytuje data morfologii, vědě zkoumající tvarovou rozmanitost organismů. Morfologie byla jednou ze základních biologických metod až do poloviny 20. století, kdy došlo k objevení nukleových kyselin, a do popředí se dostaly molekulární metody. Další rozvoj morfologie nastává až v posledních letech a je spojen s rozvojem morfometriky. Morfometrika umožňuje měřit a statisticky vyhodnocovat jednotlivé znaky tvarů organismů.

Morfometrika se rozděluje na morfometriku klasickou, která posuzuje různé kvantitativní a kvalitativní znaky, a morfometriku geometrickou, která analyzuje tvar organismů (Marhold et Suda 2002; Neustupa 2006).

Pro vyhodnocení morfometrických dat jsou používány statistické metody. Jedná se o ordinační metody, jako je PCA (principal component analysis, analýza hlavních komponent). PCA umožňuje redukovat původní dimenzi tak, že dojde jen k minimálním ztrátám informací. PCA totiž nahradí původní znaky znaky hypotetickými, hlavními komponentami neboli hlavními osami, osy jsou vedeny ve směru největší variability mezi objekty, jsou na sebe kolmé a jsou vzájemně nekorelované. Relativní pozice objektů v původním prostoru i prostoru hlavních komponent je stejná.

Pro zpracování dat jsou ale dále používány také diskriminační analýzy, které umožňují studium rozdílů mezi dvěma nebo více skupinami objektů charakterizovaných více znaky. Diskriminační analýzy slouží k testování hypotéz, nikoli tedy k hledání jiné struktury, než které máme zadane. Diskriminační analýzy jsou dvou hlavních typů, kanonické diskriminační analýzy, které interpretují rozdíly mezi předem určenými skupinami objektů, a klasifikační diskriminační analýzy, které klasifikují objekty do skupin (Marhold et Suda 2002).

### **Klasická morfometrika**

Klasická morfometrika posuzuje jednotlivé kvantitativní a kvalitativní znaky na tělech a strukturách organismů. Konkrétně se měří jednotlivé délky, počty a úhly. Nevýhodou klasické morfometrie je absence popisu zákonitostí vývoje a proměn tvaru (Marhold et Suda 2002; Neustupa 2006).

### **Geometrická morfometrika**

Geometrická morfometrika se zabývá porovnáváním tvarů jednotlivých objektů. Pro analýzu tvaru používá srovnání konfigurace význačných bodů (landmarků; Marhold et Suda 2002).

### **2.9.3 Analýza životaschopnosti pylových zrn**

Životaschopnost (vitality) pylových zrn je klíčová pro úspěšné opylení a tedy také oplození a vývoj nového semena. Životaschopnost pylových zrn je proto intenzivně zkoumána obzvláště v souvislosti se zemědělstvím a ochranou přírody (Sakhi 2014; Vicente-Dólera 2014). K analýze životaschopnosti pylových zrn se používá několik metod.

Nejpřesnější metodou je experimentální klíčení pylových zrn, které za ideálních podmínek ukáže životaschopnost pylových zrn bez velkých chyb. Velkou nevýhodou této metody je však nutnost vyhledání, a poté také udržování potřebných často velmi náročných podmínek teploty (často střídání teplot), média a osvětlení (Soares et al. 2013).

Užívanější metodou pro posouzení životaschopnosti pylových zrn je proto jejich barvení. Výhodou barvení pylových zrn je snadná standardizace metody a její vysoká rychlost. Naopak jeho velkou nevýhodou je výrazně menší přesnost, neboť výsledky této analýzy jsou vždy pouze odhady.

Pro barvení se používají různá barviva používaná pro biologická barvení, jako jsou acetokarmín, methylenová modř, nebo TTC (trifenyltetrazolium chlorid; Peterson 2010; Sakhi 2014). Nevýhodou těchto barviv je jejich nespecifičnost a také jejich nepříznivý vliv na zdraví (např. TTC).

Jsou tedy hledány nové možnosti barvení, jako jsou fluorescenční barviva, která jsou ale náročná na vybavení (Vicente-Dólera 2014), nebo barvení podle Alexandra (1969).

Alexandr (1969) popsal barvení, které barví pylová zrna téměř všech krytosemenných, dokáže navíc dobře barevně oddělit životaschopná pylová (fuchsin barví protoplasmu červeně) od neživotaschopných (malachitová zeleň barví zeleně buněčnou stěnu).

Velkým problémem tohoto barviva jsou však jeho silně toxické obsahové látky - fenol, chloral hydrát, dusičnan rtuťnatý a dlouhý čas nutný na jeho přípravu. Dlouhým používáním tohoto barviva navíc došlo k různým úpravám protokolu, které způsobují rozdíly v získaných výsledcích (Peterson 2010). V roce 2010 proto R. Peterson a jeho spolupracovníci popsali méně toxické barvivo, které obsahuje alkohol, malachitovou zeleň, glycerol, kyselinu fuchsovou, oranž G, ledovou kyselinu octovou a destilovanou vodu. Metoda je široce využívána pro různé druhy rostlin, například leknínů (Kabátová 2012) nebo hvozdíků (Kalůsková 2012).

#### **2.9.4 Analýza semen**

Kvalita a kvantita semen výrazně ovlivňují reprodukční schopnosti jedinců. Zatímco analýza kvantity semen spočívá v jejich prostém spočítání, analýza jejich kvality je značně složitá. Nejvíce vypovídající metodou je zkoumání jejich klíčivosti. Pro experimentální klíčení semen je však nutné znát a udržet mnohdy velmi náročné podmínky (režim teplot, množství vody, druh substrátu, stratifikace; Bytnerowitz et al. 2014). Analýza je tak často prováděna měřením a vážením semen.

### **3 Metodika**

#### **3.1 Sběr vzorků**

Sběr částí rostlin potřebných pro analýzy probíhal v letech 2013 – 2014. Sběr byl prováděn celkem na 19 lokalitách (Tab. 2, Obr. 1). Vzhledem k prověření hybridizace mezi druhy *Pulsatilla patens* a *Pulsatilla pratensis* byly lokality vybírány z písemných pramenů (Kubát 1997; Skalický 1997) a ústních sdělení (K. Nepraš, Č. Ondráček) podle následujícího klíče:

1) lokality se společným výskytem druhů *Pulsatilla patens* a *Pulsatilla pratensis*

Byly vybrány všechny společné lokality uvedených druhů existující v současnosti v ČR, jejich počet je 10.

2) lokality, kde byl společný výskyt výše uvedených druhů v minulosti

Dnes se na těchto lokalitách vyskytuje již jen jeden z druhů. Upřednostněny ve výběru byly lokality, na kterých byl hlášen i výskyt hybridu a výskyt obou druhů zde byl v nedávné minulosti. Byly vybrány 3 lokality, na kterých se vyskytuje v současnosti pouze *P. pratensis*.

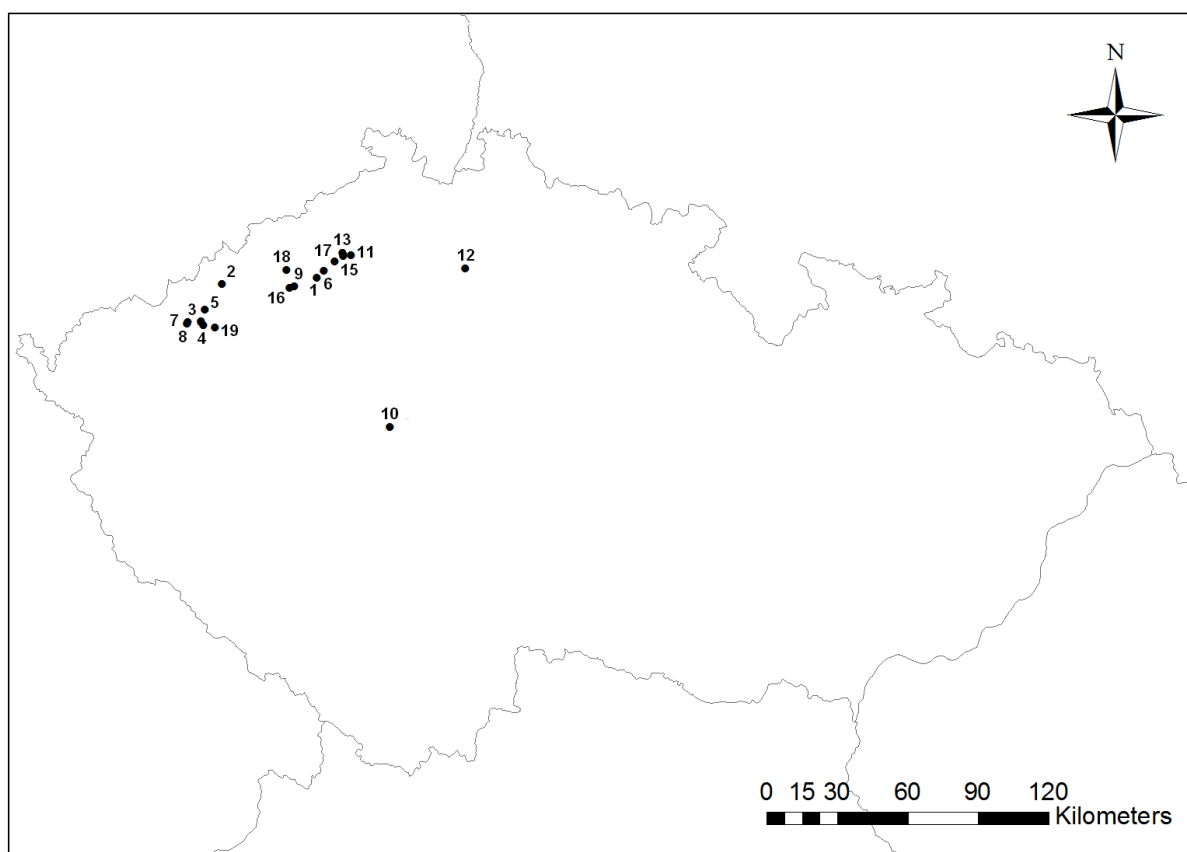
Lokalita se současným výskytem *P. patens* byla nalezena pouze 1, která byla zařazena do tohoto výzkum.

3) lokality, kde se vyskytuje pouze *Pulsatilla patens*

Takovéto lokality byly vybrány 2.

4) lokality, kde se vyskytuje pouze *Pulsatilla pratensis*

Takovéto lokality byly vybrány 3.



Obr. 1: Mapa všech lokalit sběrů. Čísla lokalit udávají tyto lokality: 1 – Boreč, 2 – Krásná Lípa, 3 – u Brodců, 4 – u Pastviny, 5 – Prostřední vrch, 6 – Třešňovka, 7 – Humnický vrch, 8 – Havraň, 9 – Tobiášův vrch, 10 – u Líšnice, 11 – Křížová hora, 12 – u Bělé pod Bezdězem, 13 – Holý vrch, 14 – úvoz, 15 – Hradiště, 16 – Číčov, 17 – Vendula, 18 – Bořeň, 19 – Dubový vrch

Všechny lokality se nalézají v České republice, a to především v Českém středohoří a Doupovských horách.

Celkové množství lokalit je sice pouze 19 lokalit, ale zahrnuje celkovou variabilitu populací, neboť byly vybrány všechny společné lokality druhů *P. patens* a *P. pratensis* a většina lokalit, kde se vyskytuje pouze *P. patens*

Tab. 2: Seznam lokalit, na kterých byly prováděny sběry, i s jejich upřesněním a GPS souřadnicemi. Čísla lokalit jsou totožná s čísly na mapě (obr. 1). Více v popisu lokalit v příloze.

<b>číslo lokality</b>	<b>lokalita</b>	<b>upřesnění lokality</b>	<b>zeměpisná šířka</b>	<b>zeměpisná délka</b>
1	Boreč	vrch Boreč v Českém středohoří	50°30'53.536"N	13°59'13.715"E
2	Krásná Lípa	přírodní památka Krásná Lípa	50°29'1.804"N	13°21'58.962"E
3	u Brodců	u obce Brodce	50°20'21.963"N	13°13'42.045"E
4	u Pastviny	u bývalé obec Pastviny	50°20'32.422"N	13°13'48.683"E
5	Prostřední vrch	Prostřední vrch u Kadaně	50°23'19.878"N	13°15'23.667"E
6	Třešňovka	vrch Třešňovka v Českém středohoří	50°29'25.297"N	13°56'45.915"E
7	Humnický vrch	Humnický vrch v Doupovských horách	50°20'36.281"N	13°8'46.284"E
8	Havraň	vrch Havraň v Doupovských horách	50°20'12.582"N	13°8'38.360"E
9	Tobiášův vrch	Tobiášův vrch v Českém středohoří	50°27'25.489"N	13°46'28.061"E
10	u Líšnice	u obce Líšnice	49°53'48.617"N	14°19'52.244"E
11	Křížová hora	Křížová hora v Českém středohoří	50°34'8.765"N	14°9'25.550"E
12	u Bělé pod Bezdězem	u obce Bělá pod Bezdězem	50°29'27.699"N	14°50'58.791"E
13	Holý vrch	Holý vrch v Českém středohoří	50°34'47.337"N	14°6'28.497"E
14	úvoz	úvoz mezi vrchem Hradiště a Holým vrchem	50°34'26.010"N	14°6'50.285"E
15	Hradiště	vrch Hradiště v Českém středohoří	50°34'7.620"N	14°6'49.188"E

16	Čičov	vrch Čičov v Českém středohoří	50°27'37.450"N	13°48'7.303"E
17	Vendula	vrch Vendula v Českém středohoří	50°32'47.418"N	14°3'21.455"E
18	Bořeň	vrch Bořeň v Českém středohoří	50°31'36.991"N	13°45'43.271"E
19	Dubový vrch	Dubový vrch v Doupovských horách	50°19'45.853"N	13°14'30.930"E

Cílem byl sběr částí 30 rostlin každého z rodičovských druhů, který se na lokalitě vyskytoval a dále materiál od všech rostlin, které vykazovaly fenotypově intermediární znaky.

Pro rostliny s intermediárními znaky jsem vytvořila dvě kategorie, a to kategorii „rostliny intermediární“ a „rostliny částečně intermediární.“ Přičemž rostliny intermediární byly rostliny se všemi znaky intermediárními nebo nějakým znakem silně intermediárním a ostatními částečně intermediárními, rostliny částečně intermediární měly zpravidla pouze jeden znak intermediární, popřípadě několik znaků částečně intermediárních a uvažovala jsem o nich především jako o možných zpětných hybridech.

Výběr sbíraných částí a jejich sběr byl proveden co nejméně invazivně s ohledem na ohroženost a ochranu *P. patens* a *P. pratensis* (byl sbírán pouze okvětní lístek a několik tyčinek místo celého květu, byl proveden sběr pouze části brakteolu a jeho úkrojky byly spočítány na lokalitě atd.).

Ne na všech lokalitách však bylo možné provést sběr od 30 rostlin rodičovských druhů, neboť několik vybraných lokalit bylo méně početných. Na jiných lokalitách sice byly sebrány vzorky listů 30 rostlin, ale nebylo možné odebrat od takového množství rostlin vzorky květů, protože zde nebylo nalezeno tolik kvetoucích rostlin.

Sběr byl prováděn ve dvou termínech, protože listy konikleců se vyvíjí až během kvetení a konečné velikosti dosahují často po odkvětu. Nejprve byly lokality navštíveny v brzkém jaře (v dubnu), přičemž byly kvetoucí rostliny označeny kovovými štítky s čísly a byl jim odebrán jeden okvětní lístek vnějšího kruhu okvětních lístků, několik tyčinek a kousek brakteolu. Dále jsem byl spočítán počet úkrojků brakteolu u každé rostliny.

Asi po měsíci, v době dozrávání semen, byl pak od každé označené rostliny odebrán jeden celý list a kousek listu dalšího (na některých lokalitách jsem odebrala list a kousek listu v různých letech). U vybraných rostlin byla spočítána semena (zralá semena byla uvolněna ze souplodí, spočítána a ponechána na lokalitě). Několika intermediárním rostlinám byla semena

odebrána. Pro označování byly používány kovové cedulky s vyraženým číslem, které byly upevněny v zemi hřebíkem, přesto se tyto cedulky (obzvlášť přes zimu) ztrácely, kromě označení je tedy dobré vytvořit i zakres označených rostlin.

Pro sběry byly vydány výjimky ze zákona č. 114/1992 Sb., o ochraně přírody a krajiny (viz přílohy).

Tab. 3: Vybrané lokality i s počtem vzorků jednotlivých taxonů.

<b>lokality</b>	<b>počet analyzovaných rostlin <i>P. patens</i></b>	<b>počet analyzovaných rostlin <i>P. pratensis</i></b>	<b>počet analyzovaných částečně intermediárních rostlin</b>	<b>počet analyzovaných intermediárních rostlin</b>
Boreč	30			
Krásná Lípa	30			
u Brodců	30			
u Pastviny		30		
Prostřední vrch		30	5	
Třešňovka		15		
Humnický vrch	30	30		14
Havraň	30	3		
Tobiášův vrch	11	19	1	
u Líšnice	7	24	6	
Křížová hora	5	1	3	4
U Bělé pod Bezdězem	11	1		1
Holý vrch	30	30	4	
úvoz	30	30	4	
Hradiště	1	30	1	1
Číčov		30		



Vendula		30		
Bořeň		27		
Dubový vrch	30	4	12	

Tab. 4: Celkový počet vzorků jednotlivých taxonů.

taxon	<i>P. patens</i>	<i>P. pratensis</i>	částečně intermediární	intermediární
<b>celkový počet vzorků</b>	275	334	36	20

### 3.2 Zpracování vzorků

Celkově bylo analyzováno 665 rostlin. Nasbíraný rostlinný materiál byl analyzován těmito přístupy: průtokovou cytometrií, morfometrikou, analýzou životaschopnosti pylových zrn, analýzou semen.

Při sběru byly rostliny přiřazovány podle vzhledu do jednoho z těchto taxonů: *P. patens*, *P. pratensis*, částečně intermediární rostliny a rostliny intermediární (viz kapitola Sběr vzorků).

Na vzorcích byla následně změřena velikost genomu pomocí průtokové cytometrie (Tab. 5) a na jejím základě byly rostliny zařazeny do jednoho ze tří taxonů (*P. patens*, *P. pratensis* a *P. × hackelli*; Tab. 6).

Tab. 5: Počet rostlin analyzovaných průtokovou cytometrií a jejich rozdělení k taxonům.

taxon	počet rostlin pro průtokovou cytometrii
<i>P. patens</i>	275
<i>P. pratensis</i>	334
částečně intermediární	36
intermediární	20

Pro analýzu velikosti genomu průtokovou cytometrií byly používány části listů, popřípadě řapíků, používání částí brakteolů nebo hodně mladých listů se neosvědčilo z důvodů přítomnosti velkého množství chlupů. Části listů byly přechovávány v lednici

v igelitových sáčkách s trochu přidané vody, vydržely takto ve vhodném stavu pro analýzu až týden.

Pro analýzy ostatními metodami bylo použito rozřazení na základě změřené velikosti genomu (Tab. 6).

Tab. 6: Počet rostlin celkově analyzovaných průtokovou cytometrií, morfometrikou, analýzou životaschopnosti pylových zrn a analýzou semen, rozřazení rostlin bylo provedeno na základě určení velikosti genomu.

taxon	Počet rostlin pro průtokovou cytometrii	počet rostlin pro morfometrické analýzy	počet rostlin pro analýzu životaschopnost i pylových zrn	počet rostlin pro analýzu semen
<i>P. patens</i>	300	300	55	39
<i>P. pratensis</i>	344	344	68	50
<i>P. × hackelii</i>	21	21	18	10

Pro morfometrickou analýzu byly používány listy, okvětní listky a brakteoly. Listy a okvětní listky byly po sebrání mírně lisovány (asi dva dny), a poté přelepeny izolepou na čtvrtku, listy byly nejprve nalepeny lepidlem. Následně byly změřeny jednotlivé znaky. Počet úkrojků brakteolů byl zjišťován na lokalitě, jejich části byly lisovány, na odebraných částech byly měřeny délky chlupů. Pro analýzu životnosti pylu a pro měření semen byl odebraný materiál v papírových sáčkách.

### 3.3 Průtoková cytometrie

Všechny analyzované rostliny byly podrobeny analýze relativní velikosti genomu pomocí průtokové cytometrie. Celkem bylo analyzováno 665 rostlin (303 rostlin *P. pratensis*, 275 *P. patens*, 36 rostlin částečně intermediárních a 20 intermediárních).

Průtoková cytometrie byla prováděna na živých listových pletivech. Používaným přístrojem byl cytometr Partec ML (Partec, Münster, Germany, UV LED jako excitační zdroj) v laboratoři průtokové cytometrie Katedry botaniky PřF UK v Praze.

Izolace a barvení jader bylo provedeno dle modifikované metodiky Doležela et al. (2007), která se osvědčila již v předběžných analýzách (Krejčová 2011).

Asi 0,5 cm<sup>2</sup> pletiva listu (řapíku) a 0,5 cm<sup>2</sup> pletiva standardu bylo nasekáno žiletkou v 0,6 ml vychlazeného pufru Otto I (0,1M monohydrát kyseliny citronové, 0,5% Tween 20;

Otto 1990) v Petriho misce, v případě malého promíchání pletiv s pufrům byla směs promíchána pipetou.

Jako standard byl použit bob (*Vicia faba* 'Inovec', 2C=26,9 pg), který má větší velikost genomu než oba studované druhy a nemůže tedy dojít k jejich záměně se standardem. Tímto postupem vzniklá suspenze byla přefiltrována přes technickou tkaninu (Uhelon, velikost oka 42 µm) a inkubována alespoň 20 minut při pokojové teplotě. Ke vzorku byl poté přidán 0,9 ml barvicího roztoku (obsahující pufr Otto II (0,4M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O; Otto 1990), antioxidant β-mercaptoethanol (2 µl/ml, Sigma) a fluorescenční barvivo DAPI (4 µl/ml), DAPI je systematickým názvem 2-(4-amidinofenyl)-1H-indol-6-carboxamidin a jedná se o fluorescenční barvivo vázající se nejvíce na úseky DNA bohaté na báze thymin a adenin. Následovala další inkubace trvající asi 1 minutu, a poté byl již vzorek analyzován na průtokovém cytometru. U vzorků bylo měřeno 5000 jader, při rychlosti 15-25 měřených jader za sekundu.

Každý jedinec pocházející ze smíšené lokality byl měřen samostatně, jedinci z lokality, kde se vyskytoval pouze jeden rodičovský druh, byly měřeny po 3. Bylo také provedeno několik měření absolutní velikosti genomu na cytometru Partec CyFlow (Partec, Münster, Germany, zelený (532 nm) *solid state* laser jako excitační zdroj) za použití barviva PI (PI je propidium jodid, který funguje jako fluorescenční barvivo nespecificky se vázající na DNA) v laboratoři průtokové cytometrie Katedry botaniky PřF UK v Praze. Toto měření bylo provedeno vždy u jedné rostliny rodičovského druhu z lokality, a u alespoň jedné hybridní rostliny z každé lokality (u 16 rostlin *P. pratensis*, 13 *P. patens* a 9 *P. × hackelii*).

Protokol měření byl shodný jako u analýzy relativní velikosti genomu na cytometru Partec ML, pouze byl přidán jiný barvicí roztok (pufr Otto II (0,4M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O; Otto 1990), RNáza A (50 µg/ml, Sigma), antioxidant β-mercaptoethanol (2 µl/ml, Sigma) a fluorescenční barviva propidium jodid (50 µg/ml, Sigma). Měřeno bylo též 5000 jader vzorku, avšak nižší rychlostí, a to 10 – 18 jader měřených za sekundu. Měření na cytometru Partec CyFlow bylo opakováno třikrát po sobě (v různé dny), aby byla snížena chyba měření.

### 3.4 Morfometrické analýzy

Morfometrické analýzy byly provedeny na vzorcích u všech 665 rostlin. Byly analyzovány listy, okvětní lístky a brakteoly. Celkem bylo analyzováno 665 listů, 623 okvětních lístků a 623 brakteolů.

Na začátku bylo vytipováno více znaků (délka chlupu na brakteolu, počet chlupů na ploše o velikosti 0, 5 cm<sup>2</sup> brakteolu, počet chlupů na ploše o velikosti 0, 5 cm<sup>2</sup> listu), které byly změřeny v průměru na 70 jedincích *P. patens* a u 70 jedinců *P. pratensis*. Hodnoty těchto znaků byly použity pro předběžné analýzy, které ukázaly veliký překryv hodnot znaků pro jednotlivé taxony. Tyto znaky byly proto vyřazeny z dalších měření a analýz.

Byla také plánována analýza tvaru listu geometrickou morfometrikou, protože listy druhů *P. patens* a *P. pratensis* se značně liší svým tvarem. Bylo ale zjištěno, že na listech není dostatečné množství vhodných landmarků, a proto byla analýza tvaru nakonec provedena hodnocením poměru obvodů a obsahů listů (Davidson et al. 2011). Znaky na květních orgánech nemohly být změřeny u všech rostlin, protože některé rostliny ani několik let po sobě nevykvetly. Přesto nebyly tyto rostliny z analýz vyřazeny, protože počet rostlin v jejich taxonu je omezený (týká se *P. patens* a *P. ×hackelii*).

Nakonec bylo analyzováno celkem 11 znaků pro klasickou morfometriku, z toho 6 znaků na listech, 3 znaky na okvětních lístcích a 1 na brakteolu. (Tab. 7). Znaky v1 až v9 byly měřeny digitálním posuvným měřítkem (přesnost 0,01 mm; Powerfix).

Tab. 7: Znaky zkoumané morfometrickými analýzami.

číslo znaku	znak	jednotka
v1	délka středního vrcholového úkojku listu	mm
v2	šířka středního vrcholového úkojku listu	mm
v3	délka řapíku lístku	mm
v4	počet úkojků lístku	bezrozměrné
v5	počet jařem listu	bezrozměrné
v6	šířka v místě větvení listu	mm
v7	délka okvětního lístku	mm
v8	šířka okvětního lístku	mm
v9	počet úkojků brakteolu	bezrozměrné
v10	barva okvětních lístků	bezrozměrné
v11	poměr obvodu a obsahu listu	bezrozměrné



Obr. 2: Měřené znaky na listu a okvětním listu.

Znak v10, barva okvětních lístků, byl získán následovně. Analýza barev květů (okvětních lístků) byla provedena v co nejkratším čase od sběru, okvětní lístek byl položen na bílý papír a srovnáván s předem vybranými (srovnáváním s květy minulý rok) barvami z certifikovaného vzorníku (Color CMYK Basic Full, 1970 barev definovaných v CMYK, RGB i HTML hodnotách, dle ICC Euroscale 2.0, DTP studio). Pro srovnání byl použit komparátor (color comparator, DTP studio), který umožňuje přesnější tzv. středové porovnávání barev (barvy jsou vedle sebe bez rušivého okolí). Srovnávání bylo prováděno za denního světla a zaznamenáno.

Barvy ze vzorníku, které se používaly pro srovnávání, byly vybrány na základě pozorování z předešlých let a byl z nich vytvořen vlastní vzorník čítající 24 barev postupujících od nejsvětlejší po nejtmaší (vzorník a tabulka barev v příloze).

Znak v11, poměr obvodu a obsahu listu, byl získán z analýzy obvodu a obsahu listu. Listy byly krátce zalisovány, a poté nalepeny tekutým lepidlem na pevný papír tak, aby se co nejméně překrývaly jednotlivé úkrojky, následně byly tyto listy přelepeny průhlednou lepicí páskou. Takto připravené vzorky byly naskenovány (skener Scan Express A3 USB 1200/600 při rozlišení 600 dpi, černobíle).

Z naskenovaných listů papírů s několika listy konikleců byly odděleny jednotlivé listy v programu IrfanView (Skiljan, verze 4.2). Naskenované listy byly také upraveny v programu GIMP (Kimball et al., verze 2.8.10), byly vymazány spoje mezi úkrojky, které by zabraňovaly

změřit jejich obvod, a byly vymazány i řapíky, protože jejich délka byla určena utržením nikoli růstem rostliny. Naopak byly dobarveny větší bílé skvrny, které se na skenu objevily oproti originálu v důsledku lesku lepicí pásky překrývající list a mohly by ovlivňovat výsledky měření.

Následně byl změřen obvod (perimeter) a obsah (area) v programu ImageJ (Rasband, verze 1.48 v). Označení objektu probíhalo pomocí nástroje „magic wand“ a každý objekt byl analyzován zvlášť (Davidson et al. 2011).

Měření obvodu a obsahu bylo prováděno i v jiných programech, ale výsledky vykazovaly velkou chybu, příkladem je program IMAGE.EXE (Karlsson, verze 1) zkonstruovaný na analýzy listů, který nedokázal u složitých změřit jejich skutečný obvod, ale pouze jejich hrubý obrys. Z dat obvodu a obsahu listů z programu ImageJ byl vypočítán jejich vzájemný poměr.

Získaná data byla zpracována pomocí mnohorozměrných statistických metod v programu SAS (SAS Institute, verze 9.2). Byly použity ordinační metody (PCA), diskriminační kanonické analýzy a klasifikační diskriminační analýzy. Standardizace dat byla provedena pro jeden soubor dat a byly porovnány výsledky získané ze standardizovaných a nestandardizovaných dat, výsledky se lišily minimálně (souřadnice grafů se lišily na pátém desetinném místě), a proto nebyla standardizace dat dále prováděna.

### **3.5 Analýza životaschopnosti pylových zrn**

Analýza pylu byla provedena u 5 rostlin (u menších populací u maximálního počtu kvetoucích rostlin) každého z rodičovských taxonů na každé lokalitě a u všech rostlin hybridních, celkem 141 rostlina. U každé rostliny bylo odebráno několik tyčinek, které poté byly uloženy v papírovém sáčku. Po několika měsících byla ve stejném čase u všech vzorků provedena analýza, na kterou bylo použito barvení podle Petersona (2010).

Od nitek byly odděleny prašníky a ty byly vloženy (několik od každé analyzované rostliny) do zkumavky s Carnoyovým fixativem (obsah 6:3:1 – 96% ethanol:chloroform:kyselina octová). Prašníky byly v Carnoyově fixativu ponechány 2-3 dny (doporučovaný čas je od 2 hodin po 12 měsíců; Peterson 2010).

Po inkubaci byly vždy 2 prašníky ze zkumavky ponechány několik minut na podložním sklíčku, aby oschly. Poté byly zakápnuty 2-3 kapkami barviva (tabulka složení barviva přílohy).

Každý prašník byl už v barvivu narušen preparační jehlou. Sklíčka byla několik minut držena nad kahanem (barvivo nesmí vřít). Prašníky byly překryty krycími sklíčky a byly pozorovány pod mikroskopem (Olympus BX41, zvětšení 40x a 100x). U každého vzorku byla spočítána pylová zrna obarvená červeně a zrna obarvená zeleně, zrna obarvená červeně byla posuzována jako životaschopná, obarvená zeleně jako neživotaschopná. Procenta (udávané v desítkách) životaschopných pylových zrn byl zaznamenán. Každý vzorek byl také několikrát nasnímán fotoaparátem (Olympus C – 7070).

### 3.6 Analýza semen

Analýza semen byla zaměřena na semena hybridů. Všechna semena hybridů, která byla nalezena, tak byla sebrána (hybrid *Pulsatilla* × *hackelii* není chráněn zákonem, tudíž na odebrání semen nebylo nutné povolení od orgánů ochrany přírody).

Byly spočítány souplodí nažek a nažky. Dále byly všechny nažky i jejich přívěsky změřeny.

Pro upřesnění dat bylo totéž provedeno u několika průměrných jedinců rodičovských druhů. Nažky však nebyly sbírány, ale počítání a měření bylo provedeno za zralosti semen na lokalitě (semena byla uvolněna ze souplodí, spočítána, změřena a následně "puštěna po větru").

## 4 Výsledky

Celkově bylo analyzováno 665 rostlin z 19 lokalit. Byly použity moderní biosystematické metody, průtoková cytometrie, morfometrické analýzy, analýza životaschopnosti pylu a analýza semen.

### 4.1 Průtoková cytometrie

Sběry z každé lokality pokrývaly celou morfologickou variabilitu, která se na lokalitě vyskytovala (rostliny *P. patens*, *P. pratensis*, částečně intermediární a intermediární). U všech 665 vzorků byla pomocí průtokové cytometrie provedena analýza velikosti genomu. Byly

detekovány tři skupiny s odlišnými intenzitami fluorescence. Dvě intenzity fluorescence byly časté, třetí se vyskytovala vzácně u několika jedinců a měla intermediární hodnotu k ostatním dvěma. Intenzity fluorescence odpovídají taxonům *P. patens*, *P. pratensis* a *P. × hackelii* (Obr. 8; Tab. 8).

Tab. 8: Průměrná relativní intenzita fluorescence včetně variačního koeficientu (cv) fluorescenčních píků u jednotlivých taxonů. Fluorescenční barvivo DAPI, standard měření *Vicia faba*.

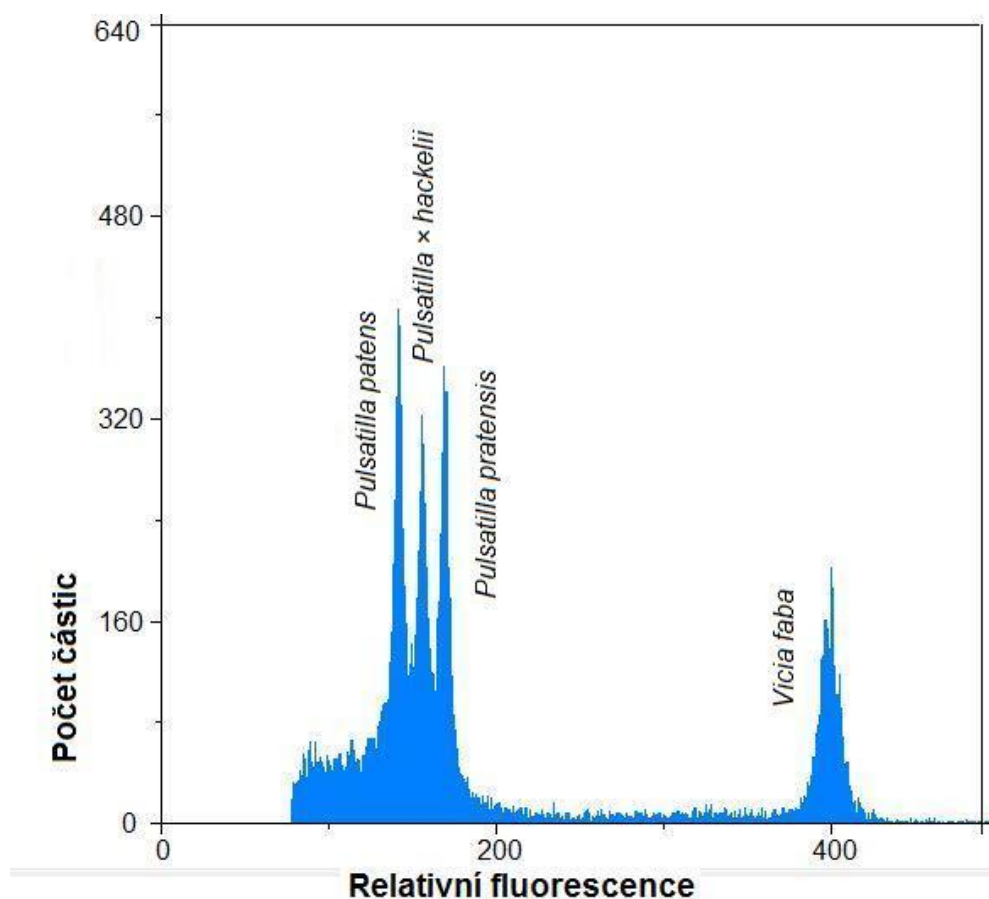
<b>taxon</b>	<b>Počet jedinců</b>	<b>Průměrná relativní intenzita fluorescence (±SD)</b>	<b>CV (%)</b>
<i>Pulsatilla patens</i>	300	0,334 (±0,005)	1,01-4,38
<i>Pulsatilla pratensis</i>	344	0,402 (±0,004)	1,07-3,94
<i>Pulsatilla × hackelii</i>	21	0,370 (±0,004)	1,72-3,76

Absolutní velikosti genomů taxonů *P. patens* (2C=11,78 pg), *P. pratensis* (2C=13,8 pg) a *P. × hackelii* (2C=12,63 pg) se také výrazně liší (Tab. 9).

Tab. 9: Průměrná absolutní intenzita fluorescence a absolutní velikosti genomu včetně variačního koeficientu (cv) u jednotlivých taxonů. Fluorescenční barvivo PI, Standard měření *Vicia faba*.

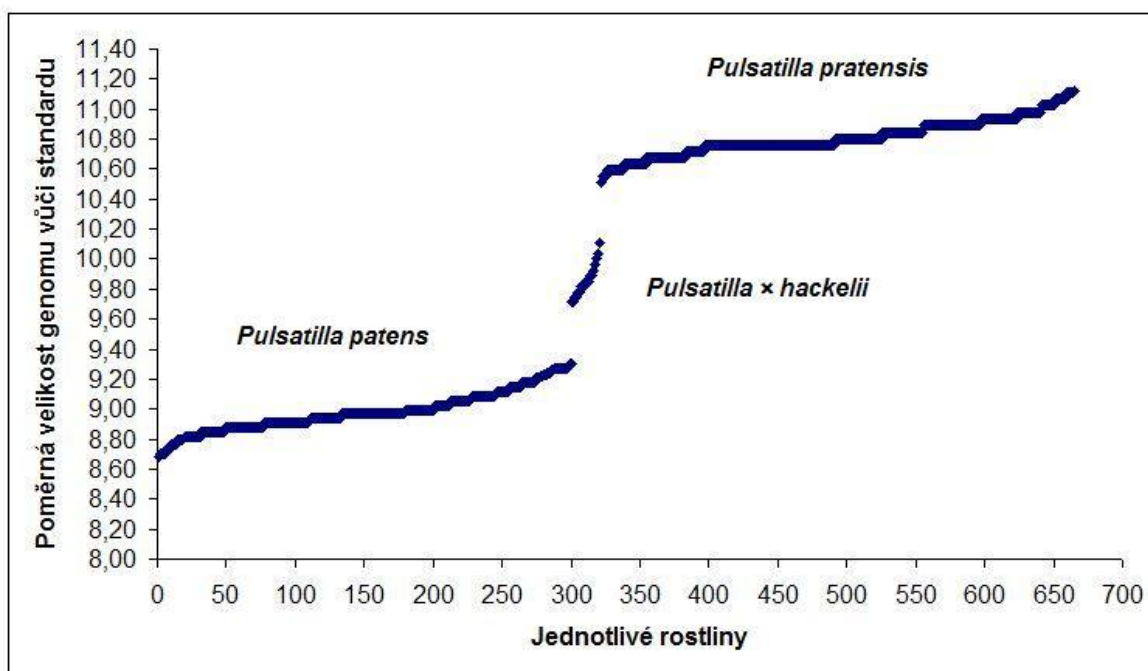
<b>taxon</b>	<b>Počet jedinců</b>	<b>absolutní intenzita fluorescence (±SD)</b>	<b>Průměrná absolutní velikost genomu 2C (pg) (±SD)</b>	<b>CV (%)</b>
<i>Pulsatilla patens</i>	13	0,398 (±0,009)	11,78 (±0,26)	1,4-5,94
<i>Pulsatilla pratensis</i>	16	0,466 (±0,009)	13,8 (±0,28)	1,39-5,64
<i>Pulsatilla × hackelii</i>	9	0,427 (±0,008)	12,63 (±0,31)	1,47-5,91





Obr. 3: Histogram relativní fluorescence. První pík odpovídá *P. patens*, druhý mezidruhovému kříženci *Pulsatilla x hackelii*, třetí *P. pratensis*. Fluorescenční barvivo DAPI, standard *Vicia faba*.

V hodnotách velikosti genomu jednotlivých taxonů existuje určitý rozptyl, jak je vidět v grafu (Obr. 4). Největší rozptyl hodnot je u taxonu *P. patens*. Velikosti genomu jednotlivých taxonů jsou však dobře ohraničené.

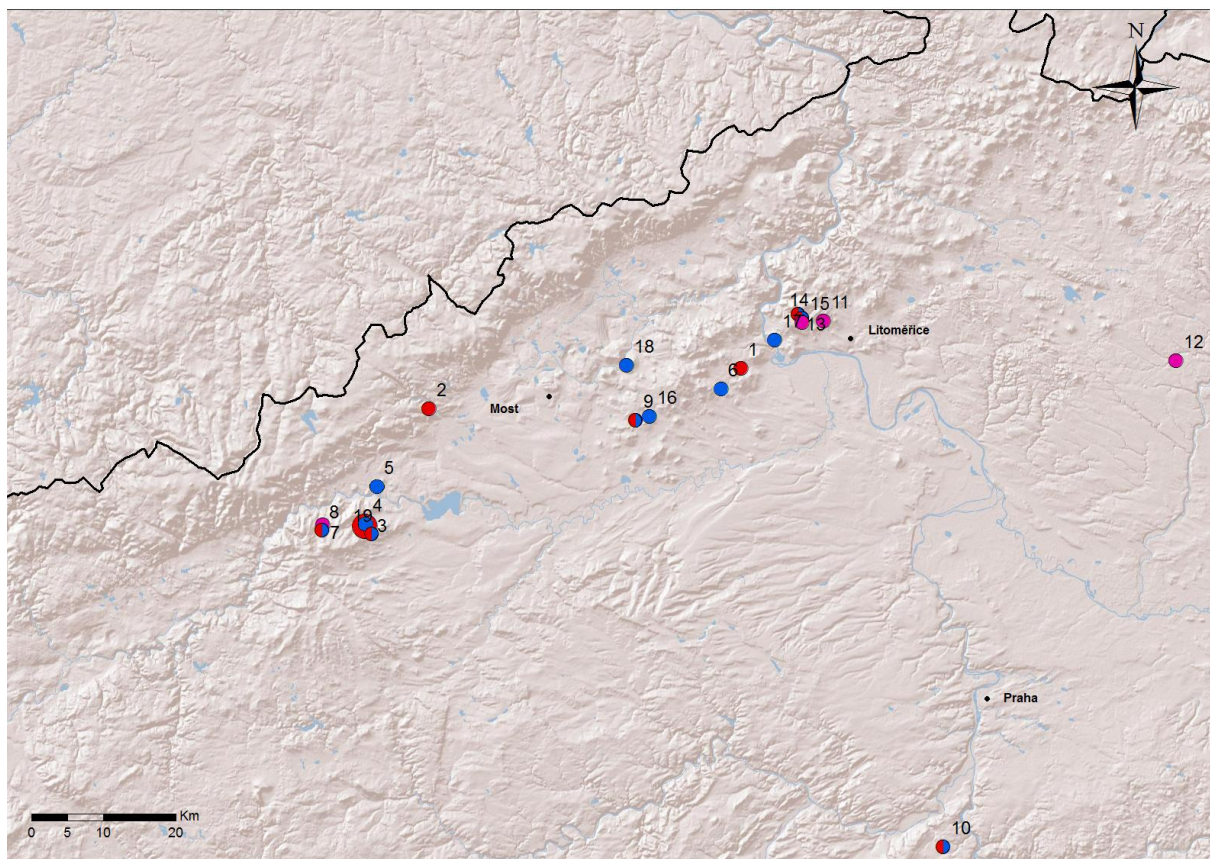


Obr. 4: Graf znázorňující poměrné velikosti genomu vůči standardu (*Vicia faba*) všech 665 studovaných rostlin. Fluorescenční barvivo DAPI.

Bylo detekováno 21 hybridních rostlin *P. × hackelii* z celkově 665 rostlin analyzovaných. Hybridní rostliny rostou na 4 společných lokalitách taxonů *P. patens* a *P. pratensis* (Tab. 10; Obr. 5).

Tab. 10: Zastoupení *Pulsatilla × hackelii* na lokalitách.

lokality	celkový počet analyzovaných rostlin	počet hybridních rostlin <i>Pulsatilla × hackelii</i>	zastoupení <i>Pulsatilla × hackelii</i> (%) (zaokrouhleno)
Humnický vrch	74	14	19
Křížová hora	13	4	31
Bělá pod Bezdězem	13	1	8
Hradiště	33	2	6



Obr. 5: Mapa všech lokalit. Červeně jsou označeny lokality *P. patens*, modře *P. pratensis*, červeno-modře společné lokality *P. patens* a *P. pratensis*, fialově společné lokality *P. patens* a *P. pratensis*, kde byl nalezen i hybridní taxon *P. × hackelii*.

Čísla lokalit udávají tyto lokality: 1 – Boreč, 2 – Krásná Lípa, 3 – u Brodců, 4 – u Pastviny, 5 – Prostřední vrch, 6 – Třešňovka, 7 – Humnický vrch, 8 – Havraň, 9 – Tobíášův vrch, 10 – u Líšnice, 11 – Křížová hora, 12 – u Bělé pod Bezdězem, 13 – Holý vrch, 14 – úvoz, 15 – Hradiště, 16 – Čičov, 17 – Vendula, 18 – Bořeň, 19 – Dubový vrch (více v kapitole Sběr vzorků).

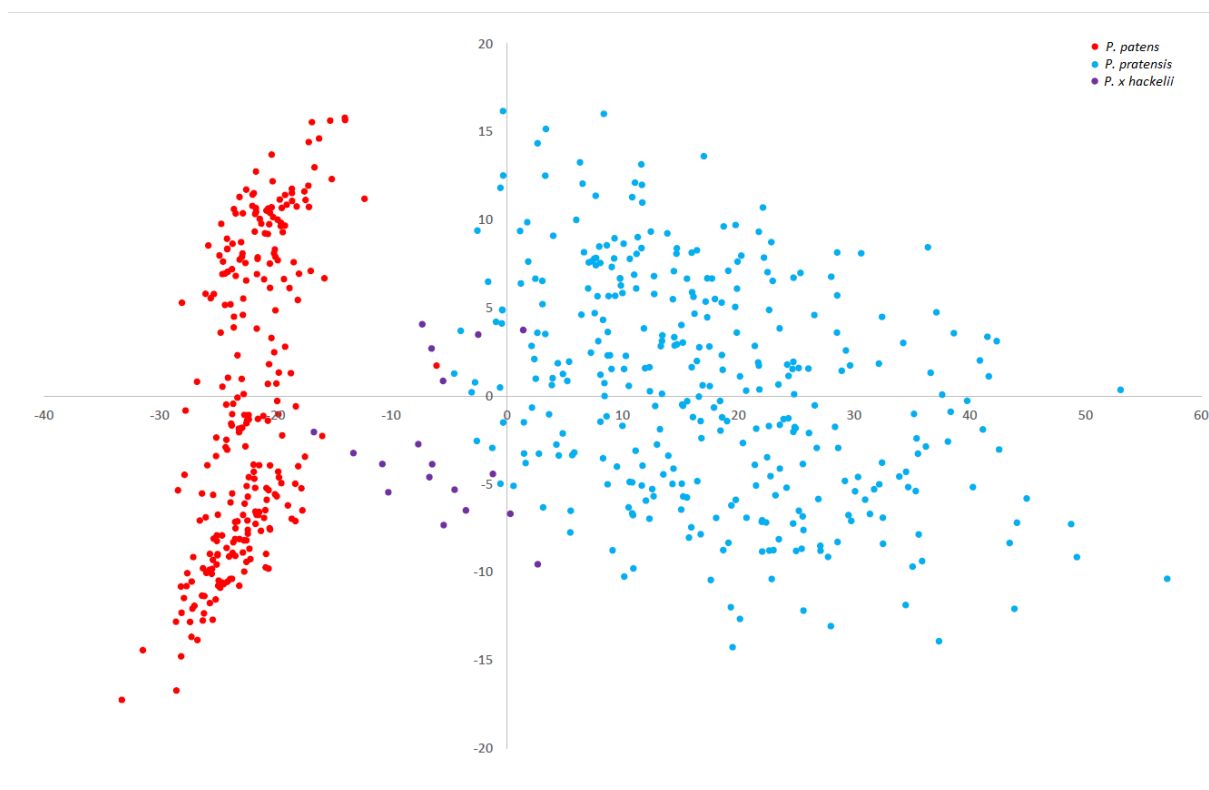
## 4.2 Morfometrické analýzy

Morfometrickými analýzami bylo studováno 300 rostlin taxonu *P. patens*, 344 rostlin taxonu *P. pratensis* a 21 hybridních rostlin *P. × hackelii*.

### 4.2.1 Ordinační metody

Analýza hlavních komponent (PCA) s využitím všech 11 morfologických znaků rozdělila studované jedince do dvou hlavních skupin. Rostliny určené na základě analýzy velikosti genomu jako *P. patens* tvořily kompaktní shluk, zatímco jedinci s velikostí genomu

odpovídající *P. pratensis* byli morfologicky mnohem variabilnější a částečně se překrývali s hybridními rostlinami (Obr. 6).



Obr. 6: Analýza hlavních komponent všech znaků všech tří taxonů, *P. patens* červená kolečka, *P. pratensis* modrá kolečka a *P. x hackelii* fialová kolečka. První komponenta vysvětluje 71,4% celkové variability, druhá komponenta 8,2% celkové variability.

Jeden jedinec určený na základě velikosti genomu jako *P. patens* byl analýzou hlavních komponent přiřazen k taxonu *P. x hackelii*. Hodnoty několika znaků této rostliny jsou bližší průměru hodnot taxonu *P. x hackelii* než taxonu *P. patens* (konkrétně znaků v1, v3, v4, v11). Rostlina je z malé lokality Křížová hora a odlišné hodnoty znaků mohou být způsobeny inbrední depresí nebo náročnými ekologickými podmínkami.

.

Znaky korelované s první komponentou, které nejvíce přispívají k oddělení taxonu *P. patens* od taxonů *P. pratensis* a *P. x hackelii* jsou: v3 - délka řapíku lístku, v4 - počet úkrojků lístku, v5 - počet jařem listu, v7 - délka okvětního lístku, v8 - šířka okvětního lístku (Tab. 11).

Tab. 11: Korelační koeficienty znaků s dvěma hlavními komponentami. Znaky, které nejvíce přispívají k oddělení skupin, jsou zvýrazněny.

označení znaku	popis znaku	1. komponenta	2. komponenta
v1	délka středního vrcholového úkrojku listu	-0,00008	-0,15420

v2	šířka středního vrcholového úkrojků listu	-0,61000	-0,16000
v3	délka řapíku lístku	<b>0,97410</b>	-0,11030
v4	počet úkrojků lístku	<b>0,86580</b>	0,02479
v5	počet jařem listu	<b>0,91850</b>	0,04198
v6	šířka v místě větvení listu	-0,01614	-0,15870
v7	délka okvětního lístku	<b>-0,72990</b>	-0,22950
v8	šířka okvětního lístku	<b>-0,65230</b>	-0,19160
v9	počet úkrojků brakteolu	0,31300	0,08780
v10	barva okvětních lístků	0,20700	0,90600
v11	poměr obvodu a obsahu listu	-0,73334	-0,18660

#### 4.2.2 Neparametrický Spearmanův test

Na souboru dat morfometrických analýz byl proveden Spearmanův neparametrický test. Korelační koeficienty nikdy nepřekročily absolutní hodnotu 0,95, která vyjadřuje těsnou korelaci. Korelační koeficienty větší jak 0,8 jsou uvedeny v tabulce (Tab. 12).

Tab. 12: Znaky s absolutní hodnotou Spearmanova neparametrického korelačního koeficientu větší jak 0,8.

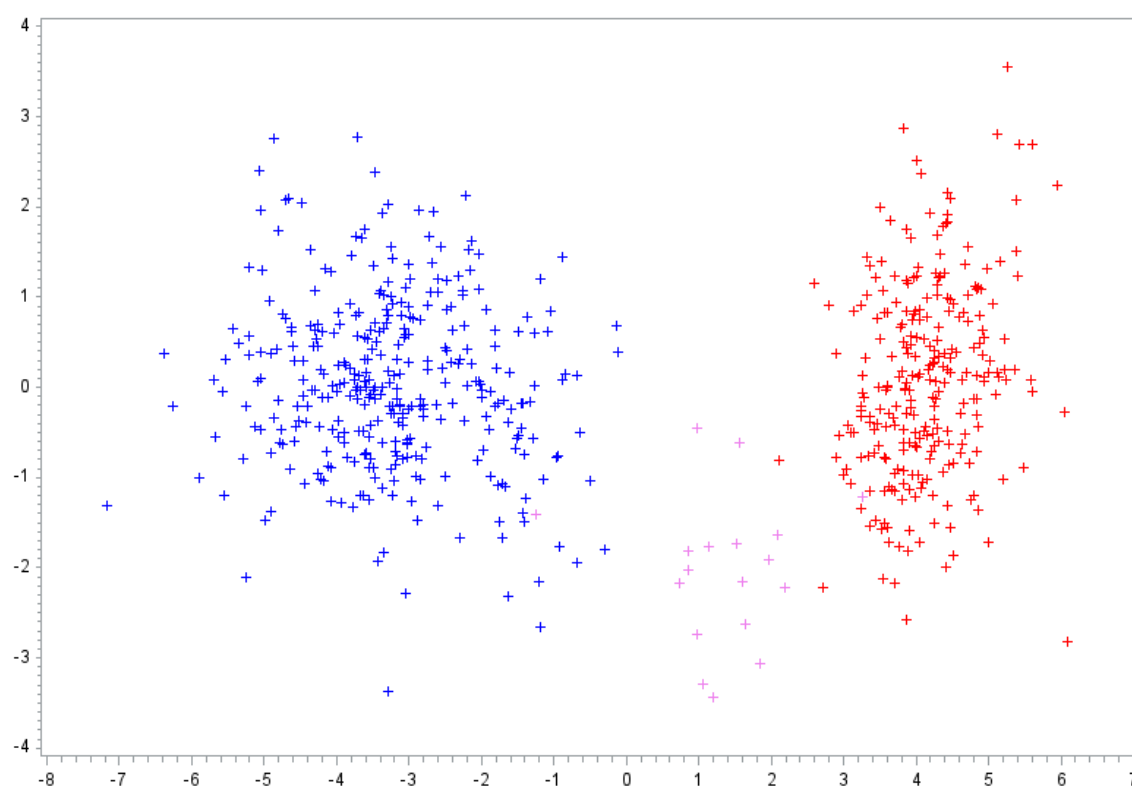
znaky	korelační koeficient
v3 v4	0,83282
v3 v5	0,85888
v4 v5	0,85401
v7 v8	0,82967

#### 4.2.3 Diskriminační metody

Diskriminační analýzy byly provedeny na souboru všech znaků, neboť neparametrický koeficient nikdy nepřekročil absolutní hodnotu 0,95, která vyjadřuje těsnou korelaci. Byly provedeny diskriminační analýzy pro soubor všech znaků všech taxonů, pro soubor znaků listů všech taxonů, pro soubor znaků květů taxonů a pro soubor všech znaků dvou taxonů *P. patens* a *P. pratensis*. Taxony byly definovány na základě velikosti genomu pomocí

průtokové cytometrie. Pro všechny znaky všech taxonů byla provedena diskriminační kanonická analýza (Obr. 7).

První kanonická osa oddělila všechny 3 taxony. Znaky korelované s první kanonickou osou, které nejvíce přispívají k tomuto rozdělení, jsou: v3 – délka řapíku lístku, v4 – počet úkrojků lístku a v5 – počet jařem listu. Druhá kanonická osa oddělila skupinu taxonu *P. × hackelii* od skupin rodičovských taxonů. Skupina *P. × hackelii* se nachází mezi skupinami rodičovských taxonů. Znaky korelované s druhou kanonickou osou, které nejvíce přispívají k tomuto oddělení, jsou: v6 – šířka v místě větvení listu, v8 a – šířka okvětního lístku a v10 – barva okvětního lístku (Tab. 13).



Obr. 7: Kanonická diskriminační analýza všech znaků všech tří taxonů, *P. patens* červené křížky, *P. pratensis* modré křížky a *P. × hackelii* fialové křížky. První kanonická osa vysvětluje 99,08% celkové variability, druhá kanonická osa 0,92%.

Tab. 13: Kanonické korelační diskriminační koeficienty prvních dvou os. Studováno bylo 11 morfologických znaků všech 3 taxonů. Zvýrazněny jsou znaky nejvíce přispívající k oddělení skupin.

označení znaku	popis znaku	1. osa	2. osa
v1	délka středního vrcholového úkrojku listu	0,03268	-0,17593
v2	šířka středního vrcholového úkrojku listu	0,69861	-0,07107
v3	délka řapíku lístku	<b>-0,88748</b>	-0,05686
v4	počet úkrojků lístku	<b>-0,81097</b>	0,12885
v5	počet jařem listu	<b>-0,98017</b>	0,02375
v6	šířka v místě větvení listu	0,20368	<b>-0,31686</b>
v7	délka okvětního lístku	0,76477	0,17850
v8	šířka okvětního lístku	0,70274	<b>-0,24032</b>
v9	počet úkrojků brakteolu	-0,27071	0,14162
v10	barva okvětních lístků	-0,18720	<b>0,25035</b>
v11	poměr obvodu a obsahu listu	0,80863	0,19813

Dále byla pro všechny znaky všech tří taxonů provedena neparametrická klasifikační diskriminační analýza. Podle této analýzy, je při  $k=21$  (21 nejbližších sousedů) správnost zařazení rostlin 97,31% procent.

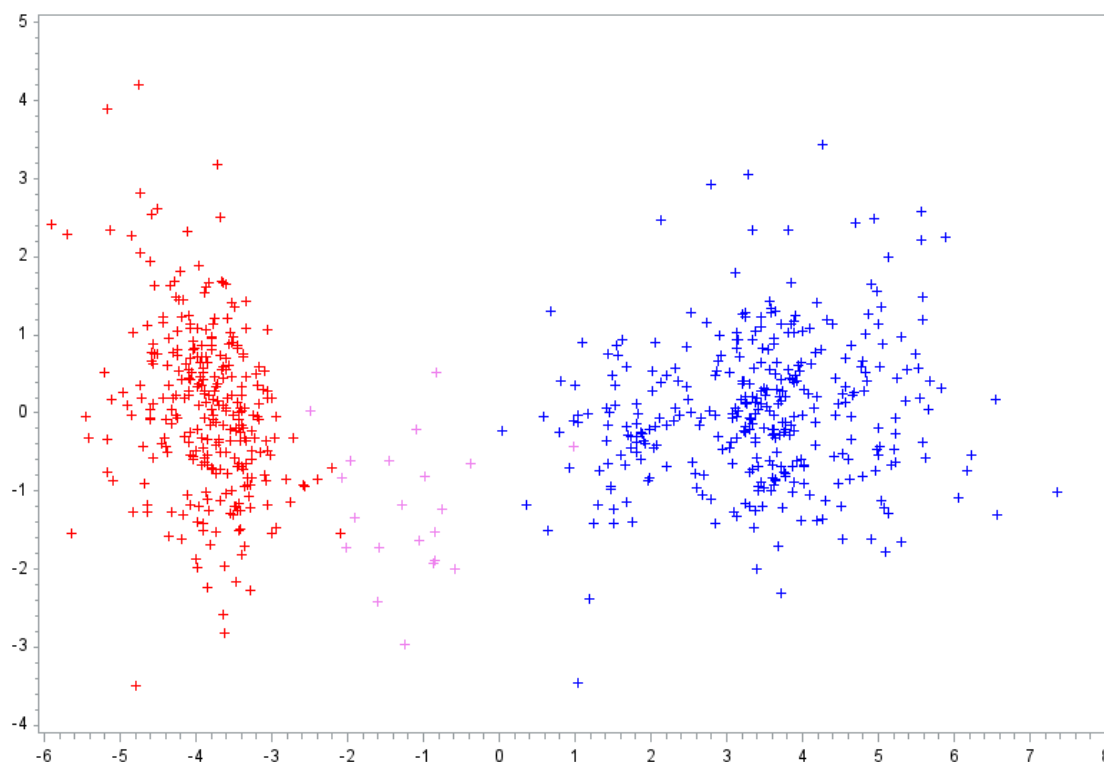
K nejčastější záměně dochází v taxonu *P. × hackelii*, kam byla přiřazena 1 rostlina z taxonu *P. patens* a 7 rostlin z taxonu *P. pratensis* (Tab. 14).

Tab. 14: Výsledky neparametrické klasifikační diskriminační analýzy při  $k=21$  pro všechny znaky všech taxonů. V závorkách je uveden podíl zařazených jedinců (%).

taxon	zařazeno k taxonu			celkem zařazených	chybně určených
	<i>P. patens</i>	<i>P. pratensis</i>	<i>P. × hackelii</i>		
<i>P. patens</i>	299 (99,67%)	0 (0%)	1 (0,33%)	300 (100%)	1 (0,33%)
<i>P. pratensis</i>	0 (0%)	337 (97,97%)	7 (2,03%)	344 (100%)	7 (2,03%)
<i>P. × hackelii</i>	0 (0%)	1 (4,76%)	20 (95,24%)	21 (100%)	1 (4,76%)
<b>celkem</b>	<b>299</b>	<b>338</b>	<b>28</b>	<b>665</b>	<b>9 (2,69%)</b>

Diskriminační analýzy pro znaky na listech byly provedeny konkrétně pro znaky: v1, v2, v3, v4, v5, v6, v11, a to pro všechny taxony (Obr. 10).

První kanonická osa od sebe oddělila všechny 3 taxony. Znaky korelované s první kanonickou osou, které nejvíce přispívají k oddělení taxonů, jsou: v3 – délka řapíku lístku, v4 – počet úkrojků lístku, a v5 – počet jařem listu. Druhá kanonická osa oddělila hybridní taxon *P. × hackelii* od taxonů *P. patens* a *P. pratensis*. Taxon *P. × hackelii* se nachází mezi rodičovskými taxony, a to blíže *P. patens* (Obr. 8). Znaky korelované s druhou kanonickou osou, které nejvíce přispívají k oddělení, jsou: v4 – počet úkrojků lístku, v6 – šířka v místě větvení a v11 – poměr obvodu a obsahu listu (Tab. 15).



Obr. 8: Kanonická diskriminační analýza znaků na listech všech tří taxonů, *P. patens* červené křížky, *P. pratensis* modré křížky a *P. × hackelii* fialové křížky. První kanonická osa vysvětluje 99,64% celkové variability, druhá osa vysvětluje 0,36%.



Tab. 15: Kanonické korelační diskriminační koeficienty prvních dvou os. Studováno bylo 7 morfologických znaků listů všech taxonů. Zvýrazněny jsou znaky nejvíce přispívající k oddělení daných skupin.

označení znaku	popis znaku	1. osa	2. osa
v1	délka středního vrcholového úkrojků listu	-0,00622	-0,16731
v2	šířka středního vrcholového úkrojků listu	-0,68307	-0,00818
v3	délka řapíku lístku	<b>0,89507</b>	-0,07741
v4	počet úkrojků lístku	<b>0,82035</b>	<b>0,19521</b>
v5	počet jařem listu	<b>0,98422</b>	0,02302
v6	šířka v místě větvení listu	-0,22116	<b>-0,48932</b>
v11	poměr obvodu a obsahu listu	-0,80298	<b>0,38263</b>

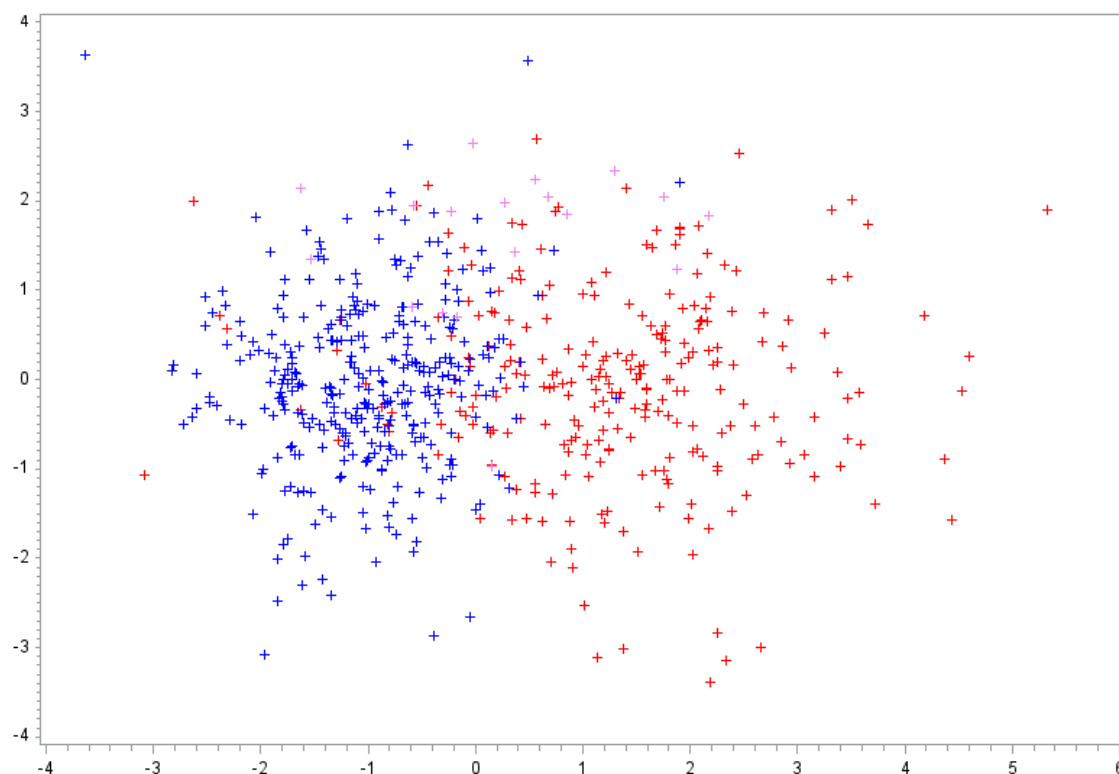
Dále byla pro znaky na listech všech tří taxonů provedena neparametrická klasifikační diskriminační analýza. Podle této analýzy, je při  $k=2$  (2 nejbližší sousedé) správnost zařazení rostlin 98,32% procent. K záměně došlo u taxonu *P. × hackelii*, do kterého byla přiřazena 1 rostlina taxonu *P. pratensis*, a dále u taxonu *P. pratensis*, do kterého byla přiřazena 1 rostlina taxonu z taxonu *P. × hackelii* (Tab. 16).

Tab. 16: Výsledky neparametrické klasifikační diskriminační analýzy při  $k=2$  pro znaky na listech všech taxonů. V závorkách je uveden podíl zařazených jedinců (%).

taxon	zařazeno k taxonu			celkem zařazených	chybně určených
	<i>P. patens</i>	<i>P. pratensis</i>	<i>P. × hackelii</i>		
<i>P. patens</i>	300 (100%)	0	0	300	0 (0%)
<i>P. pratensis</i>	0	343 (99,71%)	1 (0,29%)	344	1 (0,29%)
<i>P. × hackelii</i>	0	1 (4,76%)	20 (95,24%)	21	1 (4,76%)
<b>celkem</b>	<b>300</b>	<b>344</b>	<b>21</b>	<b>665</b>	<b>2 (1,68%)</b>

Diskriminační analýzy pro znaky na květech byly provedeny pro všechny taxony, konkrétně pro znaky: v7, v8, v9 a v10 (Obr. 11). Diskriminační analýzou květních znaků došlo pouze k částečnému oddělení taxonů. Jednotlivé taxony sice tvoří shluky, ale ty se výrazně překrývají. První kanonická osa vyjadřuje tendenci k oddělení všech taxonů. Druhá kanonická

osa vyjadřuje tendenci k oddělení hybridu *P. × hackelii*. Skupina *P. × hackelii* se nachází mezi skupinami rodičovských druhů (Obr. 9). Znaky korelované s první kanonickou osou, které nejvíce přispívají k oddělení, jsou: v7 – délka okvětního lístku a v8 – šířka okvětního lístku. Znaky korelované s druhou kanonickou osou, které nejvíce přispívají k oddělení *P. × hackelii* jsou: v8 – šířka okvětního lístku a v10 – barva okvětních lístků (Tab. 17).



Obr. 9: Kanonická diskriminační analýza znaků na květech všech tří taxonů, *P. patens* červené křížky, *P. pratensis* modré křížky a *P. × hackelii* fialové křížky. První kanonická osa vysvětluje 94,62% celkové variability, druhá osa pak 5,38% celkové variability.

Tab. 17: Kanonické korelační diskriminační koeficienty prvních dvou os. Studovány byly 4 morfologické znaky květů všech taxonů. Zvýrazněny jsou znaky nejvíce přispívající k oddělení daných skupin.

označení znaku	popis znaku	1. osa	2. osa
v7	délka okvětního lístku	<b>0,98237</b>	-0,16085
v8	šířka okvětního lístku	<b>0,89866</b>	<b>0,36080</b>
v9	počet úkrojků brakteolu	-0,34570	-0,20068
v10	barva okvětních lístků	-0,23754	<b>-0,33049</b>

Pro znaky na květech všech tří taxonů byla také provedena neparametrická klasifikační diskriminační analýza. Podle této analýzy, je při  $k=8$  (8 nejbližších sousedů) správnost zařazení rostlin 76%.

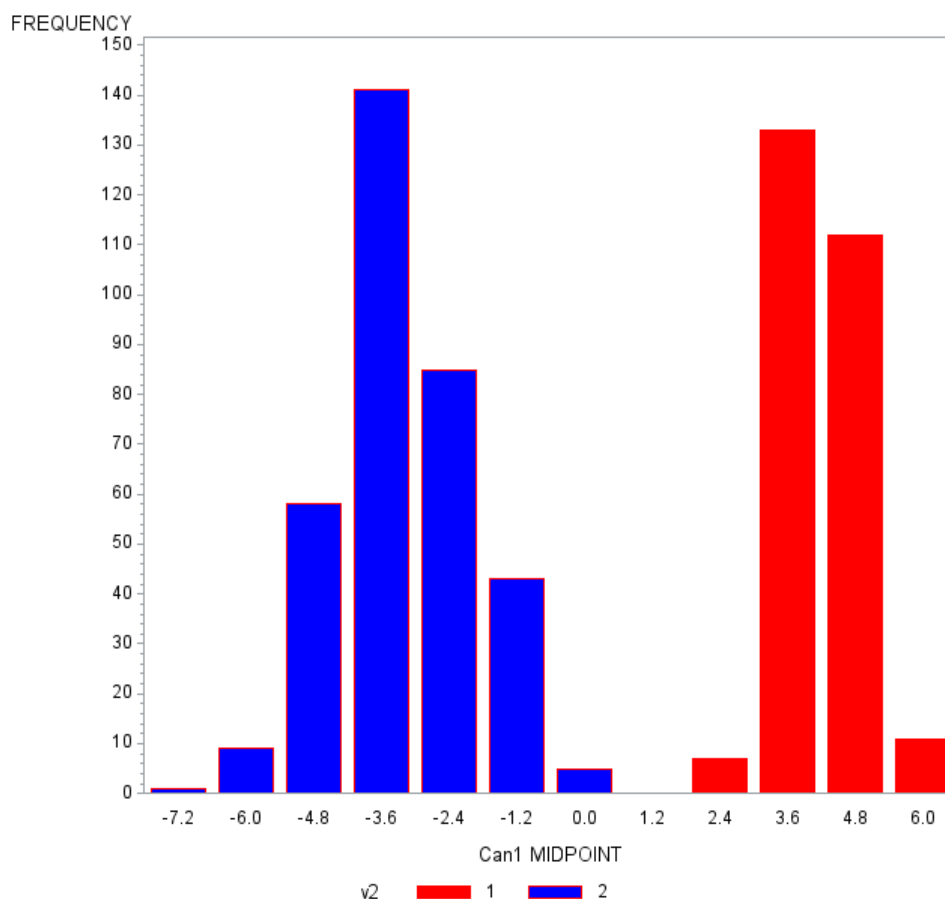
K nejčastější záměně došlo u taxonu *P. × hackelii*, kam bylo přiřazeno 38 rostlin z taxonu *P. patens* a 46 z taxonu *P. pratensis* (Tab. 18).

Tab. 18: Výsledky neparametrické klasifikační diskriminační analýzy při  $k=8$  pro znaky na květech všech tří taxonů. V závorkách je uveden podíl zařazených jedinců (%).

taxon	zařazeno k taxonu			celkem zařazených	chybně určených
	<i>P. patens</i>	<i>P. pratensis</i>	<i>P. × hackelii</i>		
<i>P. patens</i>	191 (72,62%)	34 (12,93%)	38 (14,45%)	263	72 (27,38%)
<i>P. pratensis</i>	12 (3,51%)	284 (83,04%)	46 (13,45%)	342	58 (16,96%)
<i>P. × hackelii</i>	2 (11,11%)	3 (16,67%)	13 (72,22%)	18	5 (27,78%)
<b>celkem</b>	<b>205</b>	<b>321</b>	<b>97</b>	<b>623</b>	<b>135 (24%)</b>

Diskriminační kanonická analýza byla také provedena pro všechny znaky rodičovských taxonů *P. patens* a *P. pratensis* (Obr. 10). Taxony byly výrazně odděleny.

Znaky nejvíce vysvětlující oddělení taxonů jsou:  $v_3$  – délka řapíku lístku,  $v_4$  – počet úkrojků lístku,  $v_5$  – počet jařem listu a  $v_{11}$  – poměr obvodu a obsahu listu. (Tab. 19).



Obr. 10: Kanonická diskriminační analýza znaků taxonů *P. patens* - červené a *P. pratensis* – modře.

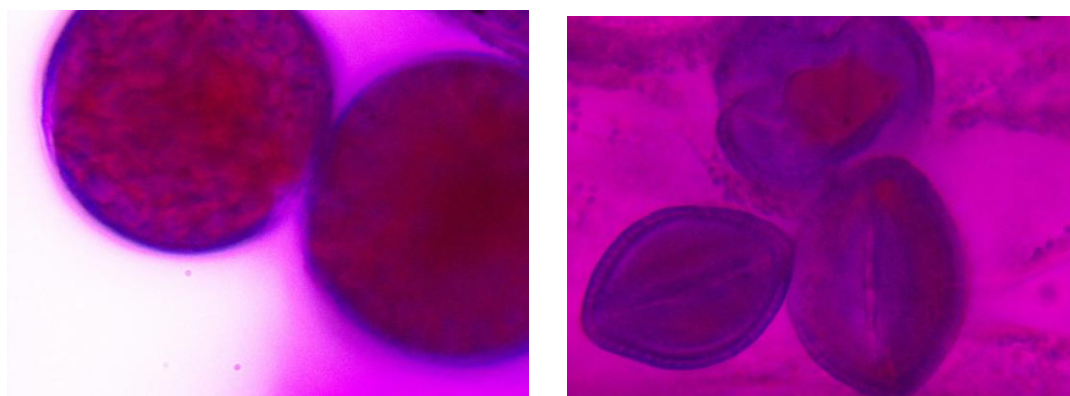
Tab. 19: Kanonické korelační diskriminační koeficienty kanonické osy. Studováno bylo 11 morfologických znaků listů dvou rodičovských taxonů *P. patens* a *P. pratensis*. Zvýrazněny jsou znaky nejvíce přispívající k oddělení daných skupin.

označení znaku	popis znaku	kanonická osa
v1	délka středního vrcholového úkrojků listu	0,02914
v2	šířka středního vrcholového úkrojků listu	0,69929
v3	délka řapíku lístku	<b>-0,88764</b>
v4	počet úkrojků lístku	<b>-0,81027</b>
v5	počet jařem listu	<b>-0,97959</b>
v6	šířka v místě větvení listu	0,20100
v7	délka okvětního lístku	0,77199
v8	šířka okvětního lístku	0,70906
v9	počet úkrojků brakteolu	-0,26887

v10	barva okvětních lístků	-0,18282
v11	poměr obvodu a obsahu listu	<b>0,81503</b>

## 4.4 Analýza životaschopnosti pylových zrn

Životaschopnost pylových zrn byla zhodnocena pomocí barvení podle Petersona (2010).



Obr. 11: Životaschopná (vlevo) a neživotaschopná (vpravo) pylová zrna *P. × hackelii*.

Průměrný podíl životaschopných pylových zrn u rodičovského druhu *P. patens* byl 74%, rozptyl hodnot pro jednotlivé lokality byl 52 – 94%. Průměrný podíl životaschopných pylových zrn u druhého rodičovského druhu *P. pratensis* byl 85%, rozptyl hodnot průměrných pro jednotlivé lokality byl 70 – 96% (Tab. 21). U hybridních rostlin byla průměrný podíl životaschopných pylových zrn 29%, rozptyl průměrných hodnot byl 10 – 60 % životaschopných pylových zrn (Tab. 20).

Tab. 20: Průměrné množství životaschopného pylu v procentech.

taxon	podíl životaschopných pylových zrn (%) ( $\pm$ SD)	rozptyl životaschopných pylových zrn (%) (min – max)
<i>P. patens</i>	73,82 ( $\pm$ 17,27)	52 - 94
<i>P. pratensis</i>	84,26 ( $\pm$ 13,86)	70 - 96
<i>P. × hackelii</i>	28,34 ( $\pm$ 18,86)	10 - 60

## 4.5 Analýza semen

Pouze 12 rostlin *Pulsatilla* × *hackelii* vytvořilo semena (z 18 kvetoucích). Většina jedinců vytvořila pouze 1 souplodí nažek, přestože květů vytvořili více. Oba rodičovské druhy vytvořily průměrně 4 souplodí nažek. Nejvyšší průměrný počet nažek byl 90 u taxonu *P. pratensis*, rozptyl byl 65 až 118 nažek. U taxonu *P. pratensis* bylo analyzováno 50 jedinců z 5 lokalit. Průměrný počet nažek taxonu *P. patens* byl 70 a rozptyl byl 52 až 91 nažek. Analyzováno bylo 39 jedinců z 5 lokalit. Průměrný počet nažek u hybridního taxonu *P.* × *hackelii* byl 67, rozptyl byl 44 až 89 nažek. Analyzováno bylo 12 jedinců z 3 lokalit.

Průměrné hodnoty délky a šířky nažek rodičovských taxonů *P. patens* a *P. pratensis* jsou velmi si podobné, hodnoty délky chmýru také, liší se jen o 0,28 cm. Průměrné hodnoty délky, šířky a délky chmýru nažek *P.* × *hackelii* jsou oproti hodnotám rodičovských taxonů výrazně menší (Obr. 12, Tab. 21).



Obr. 12: Srovnání velikostí nažek rodičovských taxonů a 3 rostlin hybridu z lokality Humnický vrch. Zleva *P. patens* (č. 1), *P.* × *hackelii* (č. 2, 3, 4) a *P. pratensis* (č. 5).

Tab. 21: Srovnání průměrných hodnot znaků nažek u všech taxonů.

taxon	počet jedinců	počet lokalit	prům. počet souplodí nažek ( $\pm$ SD)	prům. počet nažek ( $\pm$ SD)	prům. délka nažky (cm) ( $\pm$ SD)	prům. šířka nažky (cm) ( $\pm$ SD)	prům. délka přívěsku nažky (cm) ( $\pm$ SD)
<i>P. patens</i>	39	5	4 ( $\pm$ 2)	70 ( $\pm$ 17)	0,46 ( $\pm$ 0,05)	0,16 ( $\pm$ 0,05)	2,42 ( $\pm$ 0,45)
<i>P. pratensis</i>	50	5	4 ( $\pm$ 1)	90 ( $\pm$ 24)	0,5 ( $\pm$ 0,07)	0,16 ( $\pm$ 0,05)	2,7 ( $\pm$ 0,8)
<i>P. <math>\times</math> hackelii</i>	12	3	1 ( $\pm$ 1)	67 ( $\pm$ 14)	0,28 ( $\pm$ 0,08)	0,14 ( $\pm$ 0,05)	1,22 ( $\pm$ 0,14)

## 4.6 Určovací klíč

Pro určení rodičovských taxonů *P. patens*, *P. pratensis* a hybridního taxonu *P.  $\times$  hackelii* byl vytvořen určovací klíč. Znaky pro určovací klíč byly vybrány na základě diskriminačních určovacích analýz a uvedené hodnoty byly zjištěny použitím univariální analýzy (program SAS 9.3). Hodnoty kvantitativních znaků jsou uvedeny jako: (minimum-) dolní kvantil (90% jedinců) – horní kvantil (10% jedinců) (-maximum).

- 1a list celkově velmi členitý, s velkým množstvím lístečků a úkrojků, za květu již téměř vyvinutý, květ nící, barva tmavě fialová  
počet jařem listu (2-) 3 – 5 (-6), délka řapíku prostředního lístku (11,1-) 20,2– 49,7 (-76,4) mm, počet úkrojků lístku (6-) 13 – 38 (-58),  
délka okvětního lístku (5,9-) 16,6 – 25,5 (-32,8) mm, šířka okvětního lístku (5,2-) 6,9 – 10,8 (-16,3) mm *P. pratensis*
- 1b list málo členitý, s malým množstvím lístečků a úkrojků, za květu téměř nevyvinutý, květ vzpřímený. 2
- 2a počet jařem listu (2-) 2 -2 (-3), délka řapíku prostředního lístku (11-) 12,3 – 23 (-28,4) mm, počet úkrojků lístku (6-) 7 – 15 (-16).  
délka okvětního lístku (15,7-) 17 –33,3 (-34,3) mm, šířka okvětního lístku (8,6-) 9,1 16,1 (-17) mm, barva středně fialová *P.  $\times$  hackelii*

- 2b počet jařem listu (1) 1 -1 (1), délka řapíku prostředního lístku (1,5-) 2,9 -5,1 (-14,1) mm, počet úkrojků lístku (2-) 5 – 9 (-13)  
délka okvětního lístku (11,4-) 25,1 – 39,5 (-48,4) mm, šířka okvětního lístku (5,3-) 9,6 – 9,6 (-20,4) mm, barva světle fialová. *P. patens*

## 4.7 Popis taxonů

Na základě vybraných znaků byl vytvořen ještě jednoduchý popis taxonů.

List: Celkově velmi členitý, s velkým množstvím lístečků a úkrojků, za květu již téměř vyvinutý. Počet jařem listu (2-) 3 – 5 (-6), délka řapíku prostředního lístku (11,1-) 20,2– 49,7 (-76,4) mm, počet úkrojků lístku (6-) 13 – 38 (-58).

Květ: květ nící, barva tmavě fialová. Délka okvětního lístku (5,9-) 16,6 – 25,5 (-32,8) mm, šířka okvětního lístku (5,2-) 6,9 – 10,8 (-16,3) mm

*P. pratensis*

List: Málo členitý, s malým množstvím lístečků a úkrojků, za květu téměř nevyvinutý. Počet jařem listu (2-) 2 -2 (-3), délka řapíku prostředního lístku (11-) 12,3 – 23 (-28,4) mm, počet úkrojků lístku (6-) 7 – 15 (-16).

Květ: Vzpřímený, barva středně fialová. Délka okvětního lístku (15,7-) 17 –33,3 (-34,3) mm, šířka okvětního lístku (8,6-) 9,1 – 16,1 (-17) mm.

*P. × hackelii*

List: Málo členitý, s malým množstvím lístečků a úkrojků, za květu téměř nevyvinutý. Počet jařem listu (1) 1 -1 (1), délka řapíku prostředního lístku (1,5-) 2,9 -5,1 (-14,1) mm, počet úkrojků lístku (2-) 5 – 9 (-13)

Květ: Vzpřímen, barva světle fialová. Délka okvětního lístku (11,4-) 25,1 – 39,5 (-48,4) mm, šířka okvětního lístku (5,3-) 9,6 – 9,6 (-20,4) mm.

*P. patens*



## 5. Diskuse

Cílem této práce bylo zhodnotit frekvenci výskytu a fertilitu hybridního taxonu *Pulsatilla* × *hackelii*.

Populace *P. patens* a *P. pratensis*, rodičovských taxonů hybrida *P. × hackelii*, se v poslední době výrazně snížily následkem činnosti člověka, druhy jsou považovány za ohrožené a na mnoha místech výskytu jsou přísně chráněné (Juśkiewicz-Swaczyna 2010; IUCN 1997, Kubát 1997; Turoňová et al. 2012; ruský zákon 1996, No 9, Art. 808).

Na malé populace druhů přitom může mít silně negativní vliv mezidruhovú hybridizace (Morgan et al. 2009). Bylo proto nutné prověřit vliv probíhající hybridizace na populace *P. patens* a *P. pratensis*.

Díky použití průtokové cytometrie, morfometrických analýz a analýz fertility byly jednoznačně detekovány hybridní rostliny, stanoveny jejich specifické morfologické znaky, zhodnocena populační struktura a prověřen vliv hybridizace na rodičovské taxony.

### 5.1 Frekvence hybridizace druhů *P. patens* a *P. pratensis*

Hybridi v rodu *Pulsatilla* byli do současné doby popisováni a rozeznáváni pouze na základě morfologických znaků nebo na základě experimentální hybridizace (Aichele et Schweigler 1975; Lindell 1998). Popis na základě morfologických znaků s sebou, ale obecně přináší veliké riziko, že dojde k chybnému určení, jak udává například studie Szentpéteriho (2007).

Popisování hybridů na základě experimentálního křížení může být zavádějící, například pokud jsou ekologické podmínky experimentu velmi odlišné od podmínek přirozených stanovišť, nebo pokud jsou kříženy druhy nevyskytující se ve smíšených populacích. Tehdy totiž mohou vznikat kříženci, kteří v přírodě nevznikají.

*Pulsatilla* × *hackelii* byl také rozeznáván pouze na základě morfologických znaků (Čelakovský 1865; Holub 1978).

Pro jednoznačné rozřazení zkoumaných rostlin do taxonů, proto byla použita průtoková cytometrie. Byla analyzována velikost genomu a hybridní rostliny *P. × hackelii* byly detekovány jako rostliny s intermediární velikostí genomu (průměrná 2C hodnota = 12,63 pg) vůči rodičovským druhům *P. patens* (2C = 11,78 pg) a *P. pratensis* (2C = 13,80 pg). Díky průtokové cytometrii tak bylo možné zjistit množství hybridních jedinců *Pulsatilla* × *hackelii* a zhodnotit strukturu jednotlivých populací.

Výskyt *P. × hackelii* byl udáván ze 17 lokalit v České republice (více v kapitole Výskyt *Pulsatilla × hackelii*), což byla většina lokalit se společným výskytem *P. patens* a *P. pratensis* (Kubát 1997, Skalický 1997).

Nepodařilo se dohledat údaje o počtech hybridních rostlin na lokalitách, ale herbářové položky, které byly prověřeny v herbáři UK, jsou ve většině případů skutečně hybridní rostliny. Výskyt *P. × hackelii* byl však hlášen i na Slovensku, v Německu a Polsku (Goliasová 1982; Zimmermann 1964).

*Pulsatilla × hackelii* byl pomocí průtokové cytometrie nalezen na 4 lokalitách, kde jsou v současnosti společně populace *P. patens* a *P. pratensis*. Jedná se o tyto lokality: vrch Hradiště (typová lokalita), Křížová hora, lokalitě u Bělé pod Bezdězem, Humnický vrch. Na třech těchto lokalitách byl jeho výskyt udáván již v minulosti (Hradiště, u Bělé pod Bezdězem, Humnický vrch).

Na ostatních společných lokalitách rodičovských druhů nebyl hybrid nalezen, přestože na většině z nich byl jeho výskyt hlášen: Dubový vrch, Tobiášův vrch, Holý vrch, u Líšnice (Skalický 1997, ústní sdělení D. Turoňová).

Na žádné z lokalit, kde se v současnosti vyskytuje pouze jeden rodičovský druh, ale v minulosti se tam vyskytovaly oba, nebyl hybrid nalezen, přestože se objevovaly údaje, že zde byl pozorován např. Třešňovka, Prostřední vrch (Kubát 1997; Obr. 13 – 15).

Důvodů, proč hybrid nebyl nalezen na lokalitách, z nich byl jeho výskyt v minulosti hlášen, často dokonce opakovaně, je určitě několik. U smíšených populací, jejichž velikost se oproti minulosti snížila, se jeví nejpravděpodobnějším důvodem mnohem nižší pravděpodobnost hybridizace. *P. × hackelii* tak v postatě nemůže vzniknout (pravděpodobně např. Holý vrch). Toto vysvětlení podporuje situace na Humnickém vrchu, kde v současnosti roste několik stovek jedinců obou druhů a populace *P. × hackelii* je zde nejsilnější.

Hlášení o výskytu hybrida na lokalitách, kde jsou populace rodičovských druhů oddělené, nebo kde jen již po dlouhou dobu populace pouze jednoho druhu, bylo pravděpodobně chybné. A za hybrida byl zaměněn jedinec rodičovského taxonu, taková situace nastala pravděpodobně na Prostředním vrchu (Holub 1978). I v současnosti zde byly nalezeny částečně intermediární rostliny, které však byly na základě průtokové cytometrie zařazeny do taxonu *P. pratensis*.

Na základě analýzy velikosti genomu bylo celkově detekováno 21 rostlin *P. × hackelii* z celkového počtu 665 zkoumaných rostlin. Celková frekvence výskytu hybrida tak byla 3,16% z analyzovaných rostlin, což je oproti údajům o neexistujících reprodukčních bariérách mezi jednotlivými druhy (Krause 1958), frekvence nízká. Celková nízká frekvence výskytu

*P. × hackelii* může být kromě existujících reprodukčních bariér způsobena poklesem populací rodičovských druhů i snížením množství jejich společných lokalit.

Frekvence výskytu *P. × hackelii* na lokalitách a populační struktura jednotlivých populací je různá (více v kapitole Sběr vzorků). Na vrchu Hradiště došlo v posledních asi sto letech k výraznému snížení populace, v současnosti zde roste 1 rostlina *P. patens* a okolo 100 rostlin *P. pratensis*. Byly zde detekovány 2 rostliny *P. × hackelii* (z celkového počtu 33 analyzovaných rostlin).

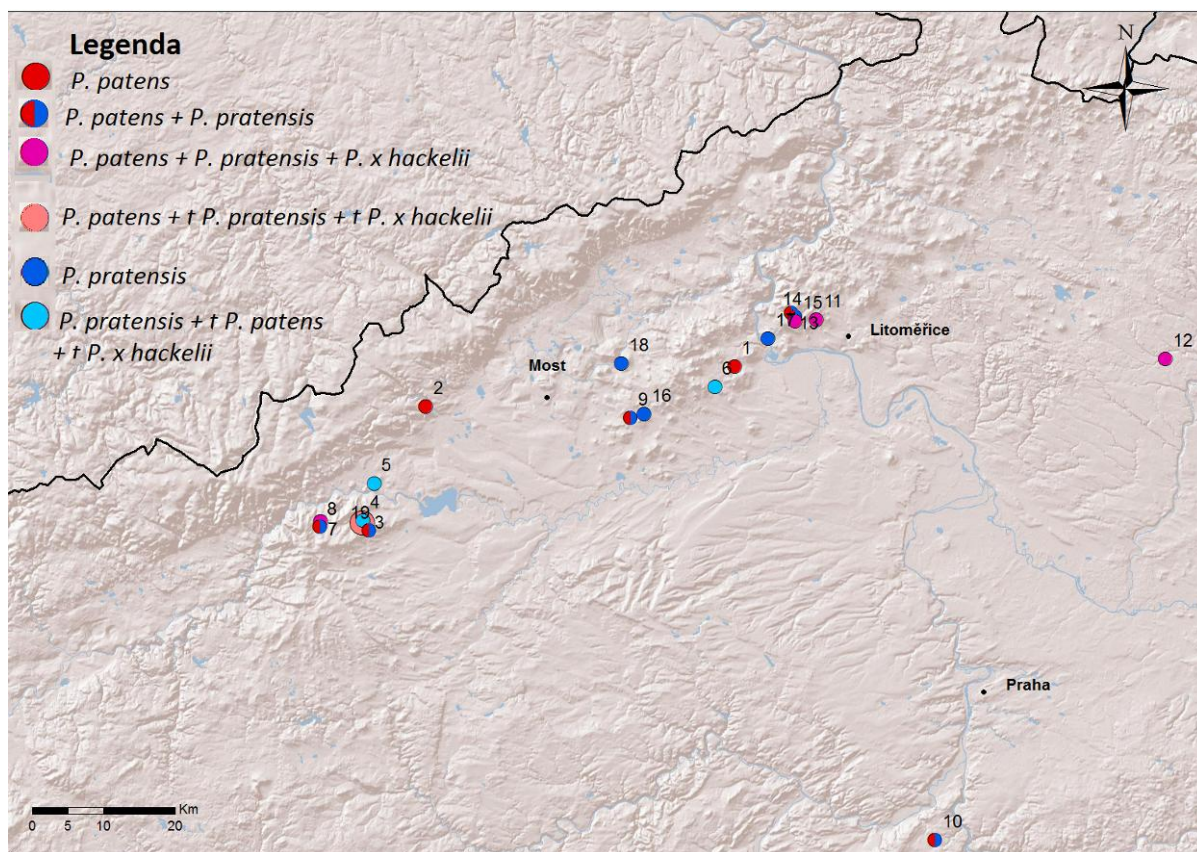
Křížová hora je znovuobjevená lokalita (ústní sdělení K. Nepraš), jejíž původní velikost populace není známa, v současnosti tvoří populaci 13 rostlin, 2 rostliny *P. pratensis* a 7 rostlin *P. patens* a hybridní rostliny *P. × hackelii* byly detekovány 4, což je 31% z celkové populace.

Populace na lokalitě u Bělé pod Bezdězem je pozůstatek několika set jedinců obou rodičovských druhů, přičemž se zde vyskytuje i *P. vernalis*. Z území je udáván i výskyt 2 dalších hybridů (z celkového počtu 4 zaznamenaných v ČR): *Pulsatilla × celakovskyana* Domin, rodičovské druhy jsou *Pulsatilla pratensis* subsp. *bohémica* a *Pulsatilla vernalis*, a *Pulsatilla × intermedia* Lsch., rodičovské druhy *Pulsatilla patens* a *Pulsatilla vernalis* (Petříček et Kolbek 1996).

V současnosti jsou populace všech druhů velmi snižené a populace *P. patens* a *P. pratensis* a populace *P. vernalis* od sebe vzdálené několik set metrů.

V obou populacích probíhá reintrodukce (Žlebčík 2002). Populace *P. patens* a *P. pratensis* se v současnosti skládá ze 13 jedinců, z 1 rostliny *P. pratensis* a 11 rostlin *P. patens*, byl zde detekován jeden hybridní jedinec *P. × hackelii*, což je 8 % z celkové populace.

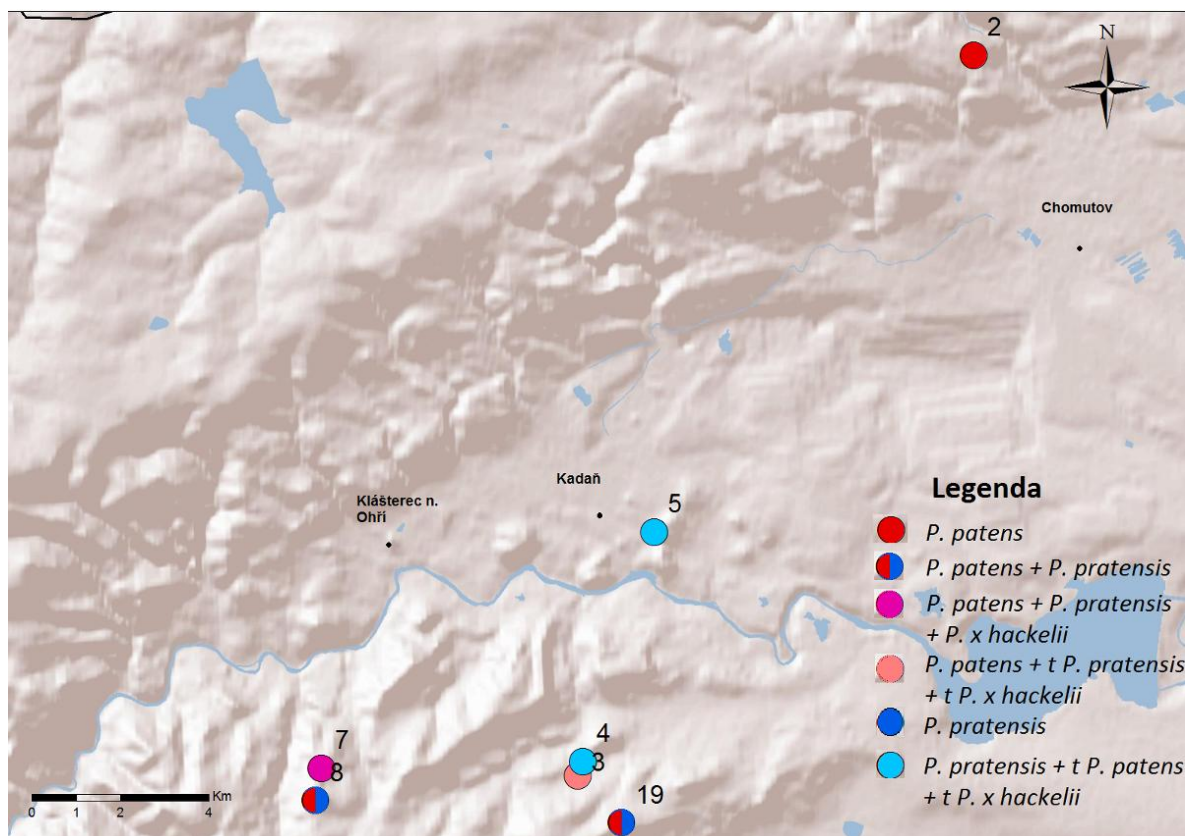
Na Humnickém vrchu se nachází nejsilnější společná populace obou druhů *P. patens* a *P. pratensis* na našem území, čítající několik set jedinců obou druhů. Rostlin *P. × hackelii* bylo detekováno 14.



Obr. 13: Mapa všech lokalit s vyznačením výskytu jednotlivých taxonů. Červeně jsou označeny lokality *P. patens*, modře *P. pratensis*, červeno-modře společné lokality *P. patens* a *P. pratensis*, fialově společné lokality *P. patens* a *P. pratensis*, kde se vyskytuje i hybridní taxon *P. × hackelii*.

Lososově jsou označeny lokality, kde se v současnosti vyskytuje pouze *P. patens*, ale v minulosti zde byl hlášen i výskyt druhu *P. pratensis* a hybridu *P. × hackelii*. Tyrkysově jsou označeny lokality *P. pratensis*, na kterých by v minulosti hlášen i výskyt *P. patens* a *P. × hackelii*.

Čísla lokalit udávají tyto lokality: 1 – Boreč, 2 – Krásná Lípa, 3 – u Brodců, 4 – u Pastviny, 5 – Prostřední vrch, 6 – Třešňovka, 7 – Humnický vrch, 8 – Havraň, 9 – Tobiašův vrch, 10 – u Lišnice, 11 – Křížová hora, 12 – u Bělé pod Bezdězem, 13 – Holý vrch, 14 – úvoz, 15 – Hradiště, 16 – Čičov, 17 – Vendula, 18 – Bořeň, 19 – Dubový vrch (více v kapitole Sběr vzorků).

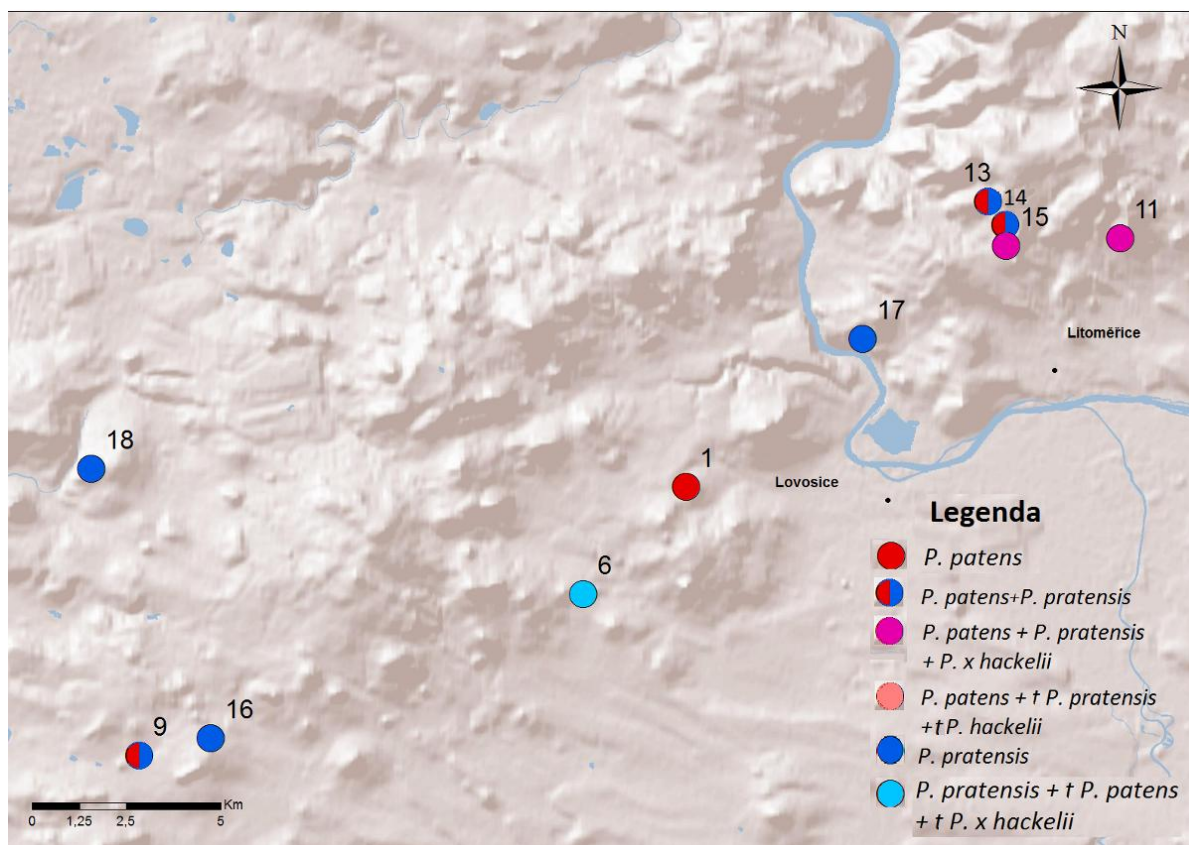


Obr. 14: Mapa lokalit v oblasti Doupovských hor a podhůří Krušných hor. Červeně jsou označeny lokality *P. patens*, modře *P. pratensis*, červeno-modře společné lokality *P. patens* a *P. pratensis*, fialově společné lokality *P. patens* a *P. pratensis*, kde se vyskytuje i hybridní taxon *P. x hackelii*.

Lososově jsou označeny lokality, kde se v současnosti vyskytuje pouze *P. patens*, ale v minulosti zde byl hlášen i výskyt druhu *P. pratensis* a hybridu *P. x hackelii*. Tyrkysově jsou označeny lokality *P. pratensis*, na kterých by v minulosti hlášen i výskyt *P. patens* a *P. x hackelii*.

Čísla lokalit udávají tyto lokality: 2 – Krásná Lípa, 3 – u Brodců, 4 – u Pastviny, 5 – Prostřední vrch, 7 – Humnický vrch, 8 – Havraň, 19 – Dubový vrch (více v kapitole Sběr vzorků).





Obr. 15: Mapa lokalit v oblasti Českého středohoří. Červeně jsou označeny lokality *P. patens*, modře *P. pratensis*, červeno-modře společné lokality *P. patens* a *P. pratensis*, fialově společné lokality *P. patens* a *P. pratensis*, kde se vyskytuje i hybridní taxon *P. × hackelii*.

Lososově jsou označeny lokality, kde se v současnosti vyskytuje pouze *P. patens*, ale v minulosti zde byl hlášen i výskyt druhu *P. pratensis* a hybrida *P. × hackelii*. Tyrkysově jsou označeny lokality *P. pratensis*, na kterých by v minulosti hlášen i výskyt *P. patens* a *P. × hackelii*.

Čísla lokalit udávají tyto lokality: 1 – Boreč, 6 – Třešňovka, 9 – Tobiášův vrch, 11 – Křížová hora, 13 – Holý vrch, 14 – úvoz, 15 – Hradiště, 16 – Čičov, 17 – Vendula, 18 – Bořeň, (více v kapitole Sběr vzorků).

Přestože byly hybridní rostliny jasně určeny na základě analýzy velikosti genomu, bylo by v budoucnosti vhodné provést ještě molekulární analýzy pro získání detailnějších informací. Možností je například provést analýzu chloroplastové DNA pro zjištění mateřského taxonu hybridů, tato informace by mohla přispět k vysvětlení distribuce *P. × hackelii*.

## 5.2 Fenotyp hybrida *Pulsatilla × hackelii*

Morfologie hybridů byla zkoumána pomocí mnohorozměrných morfometrických analýz.

Bylo analyzováno 12 morfologických znaků včetně komplexity listu (vyjádřené pomocí poměru obvodu a obsahu) a barvy květu. Cílem bylo nalézt charakteristické

morfologické znaky, podle kterých by bylo možné *P. × hackelii* odlišit i bez analýz velikosti genomu.

Při sběru vzorků byly rostliny rozdělovány do 4 skupin podle celkového fenotypu, a to *P. patens*, *P. pratensis*, částečně intermediární rostliny a intermediární rostliny (více v kapitole Sběr vzorků). Rozřazení rostlin do taxonů *P. patens* a *P. pratensis* na základě fenotypu se shodovalo se zařazením dle analýzy velikosti genomu. Všechny vzorky s intermediární morfologií byly na základě velikosti genomu průtokovou přiřazeny k *P. × hackelii*. Částečně intermediární rostliny byly kromě jedné, jejíž velikost genomu odpovídala kříženci (rostlina číslo 532 z Hradiště), na základě cytometrických dat přiřazeny k rodičovským druhům (25 k *P. patens* a 10 k *P. pratensis*).

Mezi znaky, podle kterých byly rostliny určovány, jako částečně intermediární patřila například červenofialová barva květu (vyskytující se například u rostlin *P. patens* na Dubovém vrchu nebo na Holém vrchu, ale také u rostlin *P. pratensis* na Holém vrchu), květy nící, ale téměř otevřené (vyskytující se u *P. pratensis* na Prostředním vrchu, na vrchu Třešňovka a na vrchu Vendula), nebo listy s intermediárním počtem úkrojků (vyskytující se u *P. pratensis* na Prostředním vrchu a na vrchu Čičov, u *P. patens* na lokalitě u Líšnice).

Některé z těchto částečně intermediárních rostlin byly pravděpodobně v minulosti zaměňovány s hybridy (např. rostliny s květem nícím, ale mírně intermediárním; Skalický 1997).

Rostliny *P. pratensis* var. *ochroleuca* Tausch, které se liší bělavou až zelenavou barvou okvětních lístků a vyskytují se například na Humnickém vrchu (Skalický 1997), se velikostí genomu nelišily od typických jedinců *P. pratensis*.

V ordinačních i diskriminačních morfometrických analýzách všech morfologických znaků došlo k jasnému oddělení 3 morfologických skupin, které se kryjí s taxony určenými analýzou velikosti genomu průtokovou cytometrií (*P. patens*, *P. pratensis* a *P. × hackelii*). Míra odlišení skupin se liší v závislosti na použitých morfologických znacích. Znaky na listech vykazují větší mezidruhovové rozdíly než znaky na květech, které se částečně překrývají, což lze pozorovat ve všech diskriminačních analýzách. Nejlepší oddělení skupin poskytla diskriminační analýza znaků na listech. Oddělení skupin u diskriminační analýzy všech znaků bylo slabší, neboť použití květních znaků částečně setřelo rozdíly znaků na listech. K nejslabšímu oddělení taxonů došlo u diskriminační analýzy znaků na květech.

Fenotyp hybrida *P. × hackelii* byl popisován jako intermediární vůči fenotypu jeho rodičovských druhů (Holub 1978; Skalický 1997). Typické znaky se však v různých popisech lišily. Většina autorů popisuje pouze celkový charakter listů a květů. Listy *P. × hackelii* jsou

popisovány jako intermediární, podobnější *P. patens*, ale s více jařmy, než mají listy *P. patens* (Holub 1978). Květy jsou popisovány jako červenofialové (intermediární barva oproti rodičům), popis jejich postavení se v popisech hodně liší (Čelakovský 1865; Skalický 1997).

Moderní morfometrické analýzy určily fenotyp *P. × hackelii* jako intermediární. Jako nejlepší znaky pro odlišení *P. × hackelii* byly vybrány tyto znaky: Počet jařem, délka řapíku lístku, počet úkrojků lístku a barva květu.

### 5.3 Fertilita hybrida *Pulsatilla × hackelii*

Bylo provedeno zhodnocení fertility hybridů *P. × hackelii*, a to díky analýze životaschopnosti pylových zrn a analýze semen počítáním a měřením.

Většina autorů tvrdí, že hybrid *P. × hackelii* je sterilní (Skalický 1997). Holub (1978) popisuje u *P. × hackelii* tvorbu semen. Semena však podle něj nejsou schopna vyklíčit.

Z celkového počtu 21 cytometricky ověřených hybridních jedinců kvetlo 18. Květy byly pozorovány u všech hybridních rostlin na lokalitách Humnický vrch (14), Hradiště (2), a u poloviny hybridních rostlin na Křížové hoře (2). Na lokalitě u Bělé pod Bezdězem (1) nebylo kvetení pozorováno (je možné, že z důvodu přílišného zastínění borovicemi (*Pinus nigra*)).

Pro analýzu životaschopnosti pylových zrn bylo použito jejich barvení (Peterson 2010). Podařilo se obarvit většinu pylových zrn nacházejících se ve vzorcích. V každém vzorku se nacházelo několik desítek pylových zrn, což je méně než u jiných druhů rostlin (např. rodu *Dianthus*). Rod *Pulsatilla* má totiž velké množství DNA (množství DNA u diploidních druhů je přes 10 pg/2C), velká buněčná jádra a díky tomu i velké buňky včetně pylových zrn.

U hybridního taxonu byl detekován průměrný podíl životaschopného pylu 29%. U rodičovských taxonů byly průměrné podíly mnohem vyšší, u *P. patens* 74% a u *P. pratensis* 85%. Rozptyl mezi podíly životaschopného pylu u jednotlivých hybridních rostlin byl až 50%, nejnižší množství životaschopného pylu (10%) měly obě rostliny na Křížové hoře a téměř polovina (5) rostlin na Humnickém vrchu.

Tvorba semen byla pozorována u 12 rostlin *P. × hackelii* z celkového počtu 21, a to u 1 rostliny na Hradišti, u 1 rostliny na Křížové hoře a u 10 na Humnickém vrchu. Ve většině případů bylo na rostlině pozorováno jen 1 souplodí nažek oproti průměrným 4 souplodím nažek na jedné rostlině obou rodičovských taxonů (některé větší trsy rodičovských druhů mohou mít až okolo 10 květů). Pouze 3 rostliny *P. × hackelii* měly větší počet souplodí, a to



jedna rostlina na Hradišti a jedna na Humnickém vrchu 2 souplodí a jedna rostlina na Humnickém vrchu dokonce 4.

Průměrný počet nažek v souplodí u hybridního taxonu byl srovnatelný s průměrnými počty nažek rodičovských druhů. Výrazný rozdíl byl naopak ve velikosti nažek *P. × hackelii* a rodičovských taxonů. Semena *P. × hackelii* byla výrazně menší, menší byly i jejich chmýry. Celkově semena působila nedovyvinutě a zaschle.

Hybrid *P. × hackelii* tedy není sterilní, neboť tvoří květy i semena. Množství životaschopných pylových zrn u hybridů je však výrazně sníženo. Semena však vytvořilo pouze 12 rostlin a jejich malá velikost semen naznačuje, že semena jsou nevyvinutá a tedy neschopná klíčení. Fertilita hybrida *P. × hackelii* je tedy pravděpodobně výrazně snižena.

Někteří autoři popisují i existenci potomků *P. × hackelii*, včetně zpětných hybridů, kteří však byli rozeznáváni na základě jejich morfologických znaků (Hegi et Weber 1975). Analýzou velikosti genomu pomocí průtokové cytometrie nebyli žádní zpětní hybridi detekováni.

Pro jasné zhodnocení fertility *P. × hackelii* by bylo vhodné v budoucnu provést experimentální klíčení jeho semen, popřípadě pěstování jeho potomků. V této práci nebylo klíčení semen experimentálně provedeno, protože podmínky, které pyl druhů rodu *Pulsatilla* vyžaduje, jsou popisovány jako velmi náročné a i přes jejich dodržení často k vyklíčení nedojde ani při opakujícím se výsevu již vyklíčených semen (Žlebčík et Šedivá 2012).

Přestože byl hybrid *P. × hackelii* jasně určen na základě analýzy velikosti genomu

## **5.4 Důsledky hybridizace druhů *P. patens* a *P. pratensis* pro ochranu přírody**

Frekvence výskytu a fertilita hybrida *P. × hackelii* zjištěné moderními biosystematickými metodami byly použity pro zhodnocení důsledků hybridizace pro populace rodičovských taxonů. Vzhledem ke snižování populací obou rodičovských druhů v České republice i v jiných částech jejich areálů (Grulich 2012; Juśkiewicz-Swaczyna 2010; Pilt et Kuk 2002), mohou být významně ohroženy i přirozenou mezidruhovou hybridizací, neboť negativní vlivy hybridizace (stejně jako jiných evolučních jevů) se zvyšují, pokud se velikost rodičovských populací, popřípadě jedné z nich, snižují (Morgan et al. 2009).

Hybridizace může mít na rodičovské druhy negativní vliv, který způsobuje především

intenzivní genový tok způsobený introgresí (Eroukhmanoff 2013), kompetice s hybridy (Rhymer et Simberloff 1996), nebo produkce hybridních potomků namísto potomků vlastního druhu (Levin 1996).

Frekvence hybridizace mezi druhy *P. patens* a *P. pratensis* je nízká (mezi analyzovanými rostlinami byly detekovány 3% hybridů). Fertilita hybridů je výrazně snížena, nebyli nalezeni žádní zpětní hybridi. Vliv hybridizace na populace rodičovských druhů tak pravděpodobně bude nízký a pro ochranu druhů je zásadní zachování jejich vhodných stanovištních podmínek.

Přístup zvolený v této práci (především použití průtokové cytometrie) se jistě hodí pro analýzu jiných hybridizací popisovaných mezi ohroženými druhy rodu *Pulsatilla*. Příkladem je hybridizace popisována mezi druhy *Pulsatilla zimmermanni* Soó (koniklec Zimmermannův) a *Pulsatilla pratensis* subsp. *hungarica* (koniklec luční maďarský) na Slovensku. Tato hybridizace je totiž považována za velmi častou a ohrožující mizející východopanonský endemit *P. zimmermanni*.

## 6 Závěr

Tato diplomová práce rozšiřuje naše poznání o hybridovi *Pulsatilla* × *hackelii* a jeho vlivu na ohrožené rodičovské druhy.

Pro studium byly použity moderní biosystematické metody, především průtoková cytometrie, morfometrické analýzy a analýza životaschopnosti pylu.

Hybrid *P.* × *hackelii* byl od rodičovských taxonů jednoznačně odlišen na úrovni karyologické (obsah jaderné DNA) i fenotypové.

Díky průtokové cytometrii byly nalezeny rostliny s intermediární velikostí genomu, které byly detekovány jako hybridní taxon *P.* × *hackelii*. Celkově bylo nalezeno 21 hybridních rostlin z 665 analyzovaných, které rostou na 4 lokalitách se společným výskytem *P. patens* a *P. pratensis*. Ve zbývajících smíšených populacích rodičovských druhů, ani v populacích, kde se v současnosti vyskytuje pouze jeden rodičovský druh, se *P.* × *hackelii* nevyskytuje.

Pro taxon *P.* × *hackelii* bylo na základě morfometrických analýz nalezeno několik charakteristických morfologických znaků.

U 18 rostlin *P. × hackelii* byly pozorovány květy, pouze u 12 z nich semena. Analýzou životaschopnosti pylových zrn však bylo zjištěno, že podíl životaschopných pylových zrn je u hybridních rostlin výrazně nižší než u rodičovských druhů. Nažky hybridů jsou pak nedovyvinuté. Zpětní hybridy nebyli detekováni.

Vliv hybridu *P. × hackelii* na populace rodičovských druhů *P. patens* a *P. pratensis* je kvůli jeho celkově nízké frekvenci a výrazně snížené fertilitě zanedbatelný.

## 7 Použitá literatura

- AICHELE, D. et SCHWEGLER, H. W. Die Taxonomie der Gattung *Pulsatilla*. *Feddes Rep. spec. nov. regni vegetabilis*, 1957, č. 60, s. 1-230.
- AIKEN S.G. et al. *Flora of the Canadian Arctic Archipelago*. Otava: NRC, 2007.
- ALEXANDER, M. P. Differential staining of aborted and nonaborted pollen. *Stain Technol*, 1969, č. 44, s. 117-122.
- ANDERSON, C. L., BREMER, K. et FRIIS, E. M. Dating phylogenetically basal eudicots usány *rbcl* sequences and multiple fossil reference points. *American J. Bot.*, 2005, č. 92, s. 1737-1748.
- BALATKA, B. et KALVODA, J. *Geomorfologické členění reliéfu Čech*. 1. vyd. Praha: Kartografie Praha, 2006, 79 s. ISBN: 80-7011-913-6.
- BARCALOVÁ, Eliška. *Fytocenologická studie vegetace PR Holý vrch u Hlinné (okr. Litoměřice)*. České Budějovice: JU, 2014, 50 s. Vedoucí diplomové práce Zuzana Balounová.
- BENNETT, M. D. et LEITCH, I. J. Plant Genome Size Research: A Field In Focus. *Annals of Botany*. 2005, č. 95, s. 1-6.
- BETZ, C., SCHEUER, M. et REISCH, C. Population reinforcement: A glimmer of hope for the conservation of the highly endangered Spring Pasque Flower (*Pulsatilla vernalis*). *Biol. Conserv.*, 2013, č. 168, s. 161-167.
- BOCHENKOVÁ, Martina. *Vliv dostupnosti dusíku na kritickou fázi přežívání semenáček vybraných zástupců rodu Pulsatilla a přežívání semenáček druhu Pulsatilla pratensis na lokalitě Baba v Praze: diplomová práce*. Praha: ČZU, 2011, 90 s. Vedoucí diplomové práce Michal Hejman.
- BORODINA-GRABOVSKAJA, Alissa et al. *Plants of Central Asia: plant collections from China and Mongolia*. 1. vyd. Enfield, NH: Science Publisher, 2007, 182 s. ISBN: 978-1-57808-441-812.
- BRIGGS, David. et WALTERS, Stuart Max. *Proměnlivost a evoluce rostlin*. 3. vyd. Olomouc: Vydavatelství UP, 2001, 531 s. ISBN: 80-244-0186-X.
- BYLINSKÝ, V. et ŽLEBČÍK, J. Vývoj a současný stav populace koniklece jarního (*Pulsatilla vernalis* var *vernalis*) u Bělé pod Bezdězem. *Bohemia centralis*, 2009, č. 29, s. 37-46.
- BYTNEROWICZ et al. Temperature-dependent model of *Zannichelia palustris* seed germination for application in aquatic system. *Envir. Experiment. Bot.*, 2014, č. 104, s. 44-53.
- ČELAKOVSKÝ, L. Ist *Pulsatilla hackelii* Pohl ein Bastard? *Lotos*. 1865, č. 15, s. 8-11.
- DOLEŽEL, J, GREILHUBER, J. et SUDA, J. Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. *Nature protocols*, 2007, č. 9, s. 2233-2244.
- DOLEŽEL, J. et BARTOŠ, J. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. *Ann. Bot.*, 2005, č. 95, s. 99-110.
- DOMIN, Karel. *České středohoří. Studie fytogeografická*. 1. Vyd. Praha: Jubilejní fond Královské české společnosti nauk, 1904, 258 s.
- EHRENDORFER et al. Taxonomic revision, phylogenetics and transcontinental distribution section *Anemone* (Ranunculaceae). *Bot. J. Lin. Soc.*, 2009, č. 160, s 312-354.
- EROUKHMANNOFF, F., BAILEY, R. I. et SAETRE G. P. Hybridization and geonome evolution I: The role of contingency during hybrid speciation. *Current zoology*, 2013, č. 5, s. 667-674.
- FLEGR, J. *Zamrzlá evoluce aneb je to jinak pane Darwin*. 1. vyd. Praha: Academia, 2006. 328 s. ISBN: 80-200-1453-5.
- GOLIAŠOVÁ, K. *Flóra Slovenska 3*, 1. vyd. Bratislava: Veda, 1982. 605s. ISBN: 80-224-0922-7.

- GREGORY, T. R. The C-value Enigma in Plants and Animals: A Review of Parallels and an Appeal for Partnership. *Annal of Botany*. 2005, č. 95, s. 133-146.
- GREILHUBER, J. Intraspecific variation in genome size in angiosperms: identifying its existence. *Ann. Bot.*, 2005, č. 95, s. 91-98.
- GRULICH, V. Red List of vascular plants of the Czech Republic: 3rd edition. *Preslia*, 2012, č. 84, s. 631-645.
- GRZYL, J. et al. The relationship between climatic conditions and generative reproduction of a lowland population of *Pulsatilla vernalis*: The last breath of a relict plant or a fluctuating cycle of regeneration? *Plant. Ecol.*, 2013 č. 215, s. 457-466.
- HANUŠOVÁ, K. et al. Continuous Morphological Variation Correlated with Geonome size Indicates Frequent Itrogenic Hybridization among *Diphysastrum* Species (Lycopodiaceae) in Central Europe. *PLoS ONE*, 2014, č.6.
- HEGI, Gustav. et WEBER, Heinrich. *Illustrierte Flora von Mittel-Europa*. 2. vyd. München: Lehmanns, 1975. 504 s. ISBN: 382633065X.
- HEISER, C. B. et al. The north american sunflowers (*Helianthus*). *Mem.Torrey Club*. 1969, č. 22, s. 1-218.
- HENSEN, I. et al. Genetic structure, population size and seed production of *Pulsatilla vulgaris* Mill in Central Germany. *Flora*. 2005, č. 200, s. 3-14.
- HOLUB, J. *Pulsatilla ×hackelii* Pohl. *Severočes. Přír.*, 1978, č. 8-9, s. 132-135.
- HOOT, S.B. et al. Phylogenetic relationship in *Anemone* (Ranunculaceae) based on morphology and chloroplast DNA. *Systematic Botany*, 1994, č. 19, s. 169-200.
- CHYTRÝ, M. *Vegetace České republiky*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2010, 551 s. ISBN: 9788020018960
- ILIASHENKO, V.Y. et ILIASHENKO, E. I. *Krasnaya kniga Rosii: pravovye akty*. Rusko: State Comitee of the Russian Federation, 2000, 143 s.
- JAHODÁŘ, L. *Farmakobotanika – semenné rostliny*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2005, 258 s. ISBN: 8024612259.
- JAVŮRKOVÁ - JAROLÍMOVÁ, V et MĚSÍČEK, J. *List of Chromosome Numbers of the Czech Vascular Plants*. Praha: Academia, 1992, 144 s.
- JIRAS, P. et al. Bejlmorka koniklecová (*Dasineura pulsatillae*) a další druhy hmyzu vyvíjející se v souplodích koniklece lučního českého (*Pulsatilla pratensis* subsp. *bohemica*) v přírodních památkách Na horách a Pitkovická stráň ve středních Čechách. *Bohemia centralis*, 2010, č 1, s. 251-264.
- JUSKIEWICZ-SWACZYNA, B. Distribution and abundance of *Pulsatilla patens* populations in nature reserves in north – eastern Poland. *Polish journal of natural sciences*. 2010, č. 25, s. 376-386.
- KABÁTOVÁ, Klára. *Kritické zhodnocení hybridizace mezi zástupci rodu Nymphaea pomocí cytometrických a morfometrických metod.: diplomová práce*. Praha: UK, 2012. Vedoucí diplomové práce Jan Suda.
- KALAMEES, R. et al. Adaptation to boreal forest wildfire in herbs: Responses to post-fire environmental cues in two *Pulsatilla* species. *Acta Oecologica.*, 2012, č. 38, s. 1-7.
- KALŮSKOVÁ, Jana. *Genetická variabilita a evoluční vztahy českých endemických zástupců rodu Dianthus: diplomová práce*. Praha: UK, 2012. Vedoucí diplomové práce Jan Suda.
- KRAUSE, K. Zur Taxonomischen Gliederung, Verbreitung und Genetik der *Pulsatilla halleri* (All.) Willd. *Bot. Jb*. 1958, č. 78, s. 1-68.
- KREJČOVÁ, Nikol. *Mezidruhová hybridizace mezi Pulsatilla patens a P. pratensis – význam pro druhovou ochranu: bakalářská práce*. Praha: UK, 2011, 38 s. Vedoucí diplomové práce Jan Suda.
- KUBÁT, K. *Pulsatilla patens* (L.) Mill. V České republice. *Severočes. Přír.* 1997, č. 30, s. 5-10.

- LEITCH, A. R. et LEITCH, I. J. Genomic Plasticity and Diversity of Polyploidy Plants. *Science*, 2008, č. 320, s. 481-483.
- LEVIN, D. A. et al. Hybridization and the extinction of rare plant species. *Conserv. Biol.*, 1996, č. 10, s. 10-16.
- LINDELL, T. Breeding systems and crossing experiments in *Anemone patens* and in the *Anemone pulsatilla* group. *Nord Journal of Botany*, 1998, č. 18, s. 549-561.
- LINNÉ, C. *Species plantarum*. 2. Vyd. Berlin: W. Junk, 1907, 501 s.
- LORBER, J. Historie jedné lokality, *Pulsatilla patens* u Krásné Lípy, okr. Chomutov. *Severoč. Přír.*, 1997, č. 30, s. 1-4.
- LOUREIRO, J. et al. The use of flow cytometry in the biosystematics, ecology and population biology of homoploid plants. *Preslia*, 2010, č. 82, s. 3-21.
- LYSAK, M. A. et al. The Dynamic Ups and downs of Genome Size Evolution in Brassicaceae. *Mol. Biol. Evol.*, 2009, č. 26, s. 85-98.
- MALLET, J. Hybrid speciation. *Nature*, 2007, č. 446, s. 279-283.
- MARHOLD, Karol et Suda, Jan. *Statistické zpracování mnohorozměrných dat v taxonomii: (fenetické metody)*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2002, 159 s. ISBN: 8024604388
- MOERMAN, Daniel. *Medicinal Plants of Native America: An ethnobotanical dictionary*. 2. vyd. Portland: Timber Press, 2009, 800 s. ISBN: 0881929875
- MOORA, M. et al. Native arbuscular mycorrhizal fungal communities differentially influence the seedlings performance of rare and common *Pulsatilla* species. *Functional Ecology*, 2004, č. 18, s. 554-562.
- MOORE, D. *Flora Europaea*. 1. vyd. Cambridge: Cambridge University Press, 1964, 486 s. ISBN: 0-521-06662-X.
- MORGAN, R. et al. A review of genetic analyse of hybridisation in New Zealand. *J. Royal Soc. New Zealand*, 2009, č. 1, s. 15-34.
- NEUSTUPA, J. Co to je geometrická morfometrika aneb morfologie znovu na scéně. *Živa*, 2006, č. 2, s. 54-58.
- OTTO, S. P. et WHITTON, J. Polyploid incidence and evolution. *Annual Rev. Of Genetics*, 2000, č. 34, s. 401-437.
- PETERSON, S. et al. A simplified method for differential staining of aborted and non-aborted pollen grains. *Int. Journal of Plant Biology*, 2010, č. 1, s. 66-69.
- PETŘÍČEK, V. et KOLBEK, J. Rod *Pulsatilla* v údolí Bělé ve středním Pojizeří. *Zprávy Čes. Bot. spol.*, 1996, č. 31, s. 3-10.
- PILT, I. et KUKK, Ü. *Pulsatilla patens* and *Pulsatilla pratensis* (Ranunculaceae) in Estonia: distribution and ecology. *Biology and Ecology*, 2002, č. 51, s. 242-256.
- POLÍVKA, F. *Názorná květena zemí koruny české: obsahující též čelnější rostliny cizozemské, pěstované u nás pro užitek a okrasu: se zvláštním zřetelem k jevům životním*. 1. vyd. Olomouc: Promberger, 1900, 682 s.
- RHYMER, J. M. et SIMBERLOFF, D. Extinction by hybridization and introgression. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 1996, č. 27, s. 83-100.
- RIESEBERG, L. H. *Plant speciation*. *Science*, 2007, č. 317, s. 910-914.
- RÖDER, D. et KIEHL, K. Population structure and population dynamic of *Pulsatilla patens* (L.) Mill. in relation to vegetation characteristics. *Flora*, 2006, č. 201, s. 499-507.
- SHAZIA, S. et al. Evaluation of Sorghum (*Sorghum bicolor*) Core Collection for Drought Tolerance: Pollen Fertility and Mean Performance of Yield Trakte and Its Components at Reproductive Stage. *Int. J. Agric. Biol.*, 2014, č. 2, s. 251-260.
- SCHRENK, D. et al. Feasibility study of nonclinical safety assessments on homeopathic preparations using the example of protoanemonin in *Pulsatilla pratensis* L. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 2013, č. 66, s. 104-108.

- SIMPSON, Michael. *Plant systematics*. 1. vyd. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2006, 590 s. ISBN: 0-12-644460-9.
- SKALICKÝ, V. et DOSTÁL, J. *Květena České republiky*, 1. vyd. Praha: Academia, 1997, 557 s. ISBN: 978-80-200-0590-8.
- SOARES, T. L. et al. In vitro pollen germination and pollen viability in passion fruit (*Passiflora* spp.). *Rev. Bras. Frutic.*, 2013, č. 4, s. 1116-1126.
- SPARG, S. G. et al. Biological activities and distribution of plant saponins. *J. Ethnopharmacology*, 2004, č. 2-3, s. 219-243.
- STEUDEL, E. *Nomenclator botanicus enumerans ordine alphabetico nomina atque synonyma tum generica tum soecifica et Linnaeo or recentioribus de re botanica*. Stuttgart: I. G. Gott, 1821, 900 s.
- SUDA, J. Co se skrývá za rostlinnou průtokovou cytometrií. *Živa*, 2005, č. 1, s. 46-48.
- SUDA, J. Darwinova „odporná záhada“ po 130 letech aneb souvisí polyploidie s rozmanitostí krytosemenných rostlin. *Živa*, 2009, č. 5, s. 204-208.
- SUDA, J. et PYŠEK, J. Flow cytometry in botanical research: introduction. *Preslia*, 2010, č. 1, s. 1-2.
- SUDA, J. Průtoková cytometrie a její využití v botanice. *Zprávy České botanické společnosti*, 2011, č. 25, s. 21-42.
- SUN, Y., LIU, J. et GONG, C. Isolation and evaluation of immunological adjuvant activities of saponins from the roots of *Pulsatilla chinensis* with less adverse reactions. *Int Immunopharmacol.*, 2010, č. 5, s. 584-590.
- THOMPSON, J. N. et al. Plant polyploidy and insect/plant interactions. *Am. Nat.*, 1997, č. 150, s. 730-743.
- TORVIK, S. E., BORGÉN L. et BERG, R. Y. Aspects of reproduction in *Pulsatilla pratensis* in Norway. *Nordic J. Bot.*, 1998, č. 18, s. 385-391.
- Turoňová et al. Koniklec otevřený – mírně optimistická zpráva o stavu druhu. *Ochrana přírody*, 2012, č. 5.
- UOTILA, P. et al. Decline of *Anemone patens* (Ranunculaceae) in Finland. *Acta universitatis Upsalensis*, 1996, č. 31, s. 205-210.
- URFUS, Tomáš. *Zdroje variability u Hieracium pilosella L.: diplomová práce*. Praha: UK, 2006. Vedoucí diplomové práce František Krahulec.
- VICENTE-DOLÉRA, N. et al. An improved Method to obtain novel mutants in *Cucurbita pepo* by pollen viability. *Scien. Horticul.*, 2014, č. 16, s. 14-19.
- VÍT, P. *Variabilita endemických zástupců rodu Sorbus L. v ČR: Morfometrické, karyologické a molekulární zhodnocení: diplomová práce*. Praha: UK, 2006. Vedoucí diplomové práce Jan Suda.
- WALKER, K. J. et PINCHES, C. E. Reduced grazing and the decline of *Pulsatilla vulgaris* Mill. (Ranunculaceae) in England, UK. *Biol. Conserv.*, 2011, č. 144, s. 3098-3105.
- WENNSTROM, A. et ERICSON, L. Variation in disease incidence in grazed and ungrazed sites for the system *Pulsatilla pratensis* – *Puccinia pulsatillae*. *Oikos*, 1991, č. 60, s. 30-35.
- WHITTEMORE, Thomas. *Flora of North America: Ranunculaceae*. 1. vyd. New York: Oxford University Press, 1997, 616 s. ISBN: 0-19-511246-6.
- WILLIS, K. J. et NIKLAS, K. J. The role of quaternary environmental change in plant macroevolution: the exception or the rule? *Phil. Trans.*, 2004, č. 359, s. 159-172.
- ZIMMERMANN, W. Koniklece ČSSR a jejich zvláštnosti. *Ochrana přírody*, 1964, č. 19, s. 44-47.
- ŽLEBČÍK, J. Poznámky k záchranné kultivaci některých ohrožených druhů ČR. *Acta Pruhoniciana*, 2002, č. 73, s. 3-26.
- ŽLEBČÍK, J. et ŠEDIVÁ, J. Pedologická charakteristika vybraných lokalit *Pulsatilla patens* (L.) Mill. *Acta Pruhoniciana*, 2012, č. 102, s. 9-13.

### **Internetové zdroje**

STEVENS, P. F.. Angiosperm Phylogeny Website [online]. c2001, poslední verze červenec 2012. Dostupné na World Wide Web: < <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>>

IUCN 2014. *The IUCN Red List of Threatened Species*. c2000, poslední verze červen 2014. Dostupné na World Wide Web:<<http://www.iucnredlist.org>>.



## 8 Přílohy

Příloha I: Fotografie hybrida *Pulsatilla* × *hackelii*.

Příloha II: Fotografie rodičovských taxonů *P. patens* a *P. pratensis*.

Příloha III: Naskenované listy jednotlivých taxonů.

Příloha IV: Naskenovaný list z lokality Prostřední vrch, pravděpodobně chybně určený jako list hybrida *Pulsatilla* × *hackelii*.

Příloha V: Tabulka a vzorník sloužící k určování barev.

Příloha VI: Stručný popis lokalit se zaměřením na populace taxonů rodu *Pulsatilla*

Příloha VII: Udělené výjimky z ochrany druhů *P. patens* a *P. pratensis* a vyjádření pro jednotlivé oblasti.

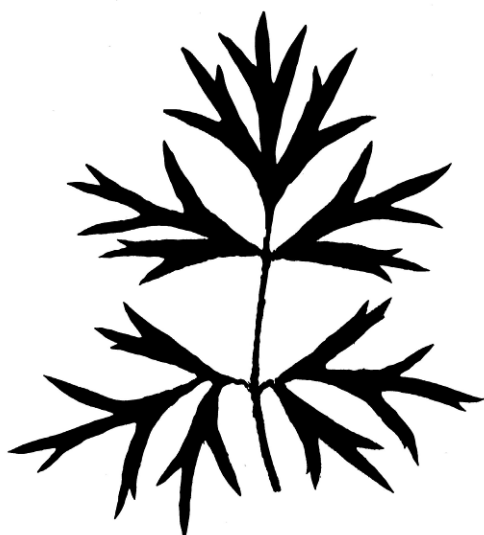
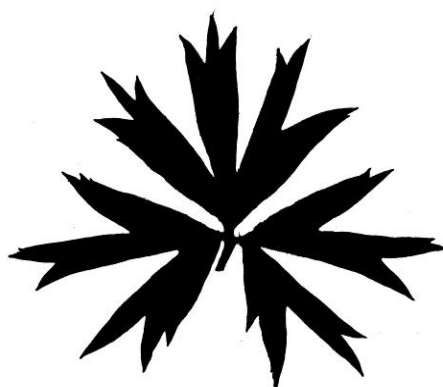
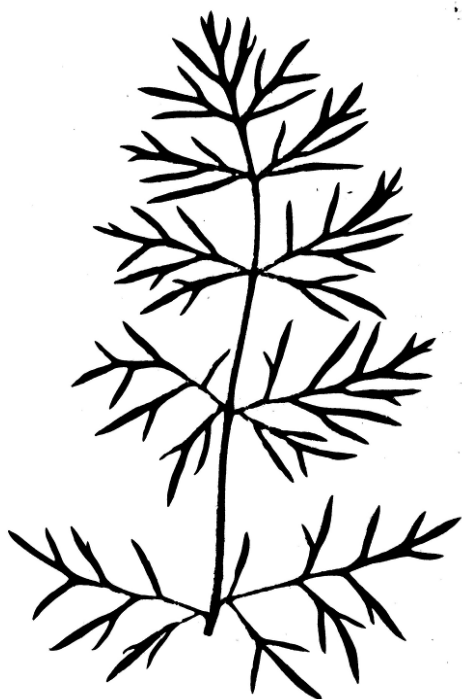
**Příloha 1: Fotografie hybrida *Pulsatilla* × *hackelii* (na Humnickém vrchu a na Hradišti).**



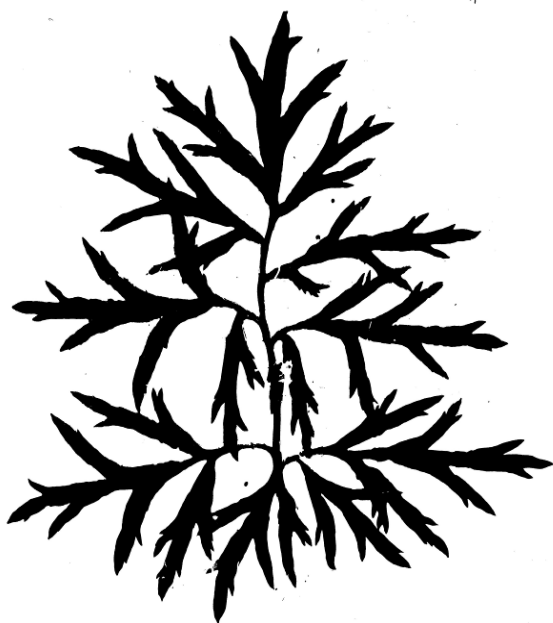
**Příloha 2: Fotografie rodičovských taxonů *P. patens* a *P. pratensis* (Humnický vrch).**



**Příloha 3: Naskenované listy jednotlivých taxonů *P. patens*, *P. pratensis* a *P. × hackelii* (bez úprav popsanych v kapitole Metodika).**



**Příloha 4: Naskenovaný list z lokality Prostřední vrch, považovaný pravděpodobně za list hybridu *Pulsatilla* × *hackelii* (Holub 1978), při sběru určen jako částečně intermediární, jedná se však o list *P. pratensis*.**



**Příloha 5: Tabulka umístění odstínů ve vzorníku Color CMYK Basic a jejich CMYK hodnoty a podle tabulky vytvořený vzorník pro určování barev (zde odstíny neodpovídají zcela původním odstínům kvůli chybě tisku).**

<b>číslo barvy v upraveném vzorníku</b>	<b>číslo stránky ve vzorníku Color CMYK Basic</b>	<b>hodnota C</b>	<b>hodnota M</b>	<b>hodnota Y</b>	<b>hodnota K</b>
<b>1</b>	95	14	28	0	0
<b>2</b>	98	28	43	0	0
<b>3</b>	101	43	57	0	0
<b>4</b>	96	43	71	0	0
<b>5</b>	85	28	100	0	0
<b>6</b>	89	28	71	0	40
<b>7</b>	86	43	100	14	0
<b>8</b>	89	43	100	0	0
<b>9</b>	93	57	86	14	0
<b>10</b>	89	57	86	28	0
<b>11</b>	102	57	71	0	20
<b>12</b>	82	43	86	28	20
<b>13</b>	80	28	86	14	40
<b>14</b>	85	28	100	0	40
<b>15</b>	83	57	100	43	0
<b>16</b>	92	43	86	0	40
<b>17</b>	99	71	100	0	0
<b>18</b>	81	14	100	0	60
<b>19</b>	85	71	100	57	0
<b>20</b>	90	43	100	0	40
<b>21</b>	98	57	86	0	40
<b>22</b>	102	71	86	0	20
<b>23</b>	78	28	100	28	60
<b>24</b>	96	71	100	14	40

1	2	3	4	5	6
7	8	9	10	11	12
13	14	15	16	17	18
19	20	21	22	23	24

## **Příloha 6: Stručný popis lokalit se zaměřením na populace taxonů rodu *Pulsatilla***

Popis obsahuje: Umístění lokality včetně GPS souřadnic, stručnou informaci o podloží a vegetaci, popis vývoje populace druhů rodu *Pulsatilla* (pokud je znám), informaci o výskytu hybridu, probíhající managementová opatření. Pokud není uvedena citace, jedná se o informace zjištěné vlastním pozorováním.

### **1. Boreč (446 m n. m.)**

GPS souřadnice: 50°30'53.536" s. š., 13°59'13.715" v. d.

Vrch Boreč se nachází v Milešovském středohoří, nad vesnicí Boreč. Podloží je znělcové (Balatka et Kalvoda 2006).

Boreč je porostlý přirozeným listnatým lesem. Na patě kopce se nachází populace několika stovek rostlin *P. patens*, u které neprobíhají žádná managementová opatření, protože nejsou potřeba (Turoňová et al. 2013).

### **2. Krásná Lípa (583 – 503 m n. m.)**

GPS souřadnice: 50°29'1.804"s. š., 13°21'58.962" v. d.

Lokalita se nachází na úpatí Krušných hor, a to u obce Krásná Lípa.

Matečnou horninou jsou dvojslídne jemnozrnné pararuly s přechodem do dvojslídnych svorů. Většina území je zarostlá řídkým listnatým lesem. Velikost populace *P. patens* klesla koncem 80. let až na pouhých několik jedinců. Lokalita je tak oplocena, jsou zde vysekávány křoviny a sečena tráva a probíhá zde reintrodukce.

V současnosti populace čítá několik desítek rostlin (Lorber 1997).

### **3. u Brodců (500 m n. m.)**

GPS souřadnice: 50°20'21.963"s. š., 13°13'42.045"v. d.

Lokalita se nachází v Doupovských horách, mezi býv. obcí Pastviny a obcí Brodce. Je na hranicích areálu Vojenského újezdu Hradiště.

Podloží je analcimický tefrit (Balatka et Kalvoda 2006).

Vegetaci tvoří rozvolněné křoviny. Lokalita byla znovuobjevena v roce 2009. V současnosti zde roste několik desítek jedinců *P. patens*. V minulosti byla lokalita využívána jako pastvina a z jejího bezprostředního okolí je popisován i výskyt *P. pratensis* a *P. × hackelii* (Kubát 1997). Jedna populace *P. pratensis* se nachází v těsné blízkosti (zde uvedena jako lokalita u Pastviny).



Je zde sečena tráva a odstraňovány křoviny, což ale vede k většímu zpřístupnění květů vysoké zvěři, která je okusuje.

#### **4. u Pastviny (499 m n. m.)**

GPS souřadnice: 50°20'32.422"s. š., 13°13'48.683"v. d.

Lokalita se nachází v Doupovských horách, u bývalé obce Pastviny, v těsné blízkosti lokality u Brodců. Podloží je tefrit (Balatka et Kalvoda 2006).

Vegetace je tvořena rozvolněnými křovinami.

V současnosti je zde několik desítek rostlin *P. pratensis*, v minulosti zde byla popisována společná populace obou druhů včetně hybrida (Kubát 1997). Je zde sečena tráva a odstraňovány křoviny.

#### **5. Prostřední vrch (399 m n. m.)**

GPS souřadnice: 50°23'19.878"s. š., 13°15'23.667"v. d.

Prostřední vrch je součástí Doupovských hor a je přímo na území města Kadaně.

Podloží tvoří alkalický bazalt (Balatka et Kalvoda 2006).

Na většině území vrchu se nachází zahradnická kolonie, jinak zde roste smíšený silně ruderální les.

V minulosti zde byla společná lokalita *P. patens* a *P. pratensis*, hlášen zde byl i výskyt *P. × hackelii* (Holub 1978). V současnosti zde roste asi 40 jedinců *P. pratensis* na skalkách, mimo les.

#### **6. Třešňovka (414 m n. m.)**

GPS souřadnice: 50°29'25.297"s. š., 13°56'45.915"v. d.

Třešňovka se nachází v Lounském středohoří, u obce Vlastislav.

Geologicky se jedná o alkalický bazalt (Balatka et Kalvoda 2006). Vrch je porostlý listnatým lesem s hojným výskytem stromů rodu *Prunus*.

Byla zde popisována smíšená populace *P. patens* a *P. pratensis*. Hlášen zde byl i výskyt hybrida *P. × hackelii* (Kubát 1997). V současnosti se zde vyskytuje pouze *P. pratensis*, a to asi 50 jedinců na vrcholu kopce. Probíhá se zde vysekávání křovin, neboť hrozí zarůst lokality.

#### **7. Humnický vrch (706 m n. m.)**

GPS souřadnice: 50°20'36.281" s. š., 13°8'46.284" v. d.

Humnický vrch je součástí Doupovských hor, nachází se ve Vojenském újezdu Hradiště.

Podloží je z alkalického živce (Balatka et Kalvoda 2006), na vrcholu je step. V současnosti se zde nachází největší společná populace *P. patens* a *P. pratensis* v ČR čítající několik set rostlin obou druhů (i tato populace se ale zmenšila o třetinu oproti minulosti; Turoňová et al. 2013). Bylo zde detekováno 14 rostlin *P. × hackelii*, jehož výskyt zde byl hlášen (Kubát 1997). Je zde prováděno několik managementových opatření, sečení trávy, strhávání drnu, vysekávání křovin (Turoňová et al. 2013).

#### **8. Havraň (736 m n. m.)**

GPS souřadnice: 50°20'12.582"s. š., 13°8'38.360"v. d.

Vrch Havraň sousedí s Humnickým vrchem, také ho pokrývá step.

Současná populace čítá několik set jedinců *P. patens* a několik jedinců *P. pratensis* (asi 10). *P. × hackelii* zde nebyl nalezen.

#### **9. Tobíášův vrch (354 m n. m.)**

GPS souřadnice: 50°27'25.489"s. š., 13°46'28.061"v. d. (lokalita *P. patens* 50°27'26.241"s. š., 13°46'26.450"v. d.)

Tobíášův vrch je součástí Lounského středohoří, tyčí se nad obcí Kozly. Podloží je bazalt (Balatka et Kalvoda 2006).

Kopec je nezalesněný, porostlý teplomilnou stepí. Vyskytuje se zde společná populace *P. patens* a *P. pratensis*. Došlo však k prostorovému oddělení a zmenšení velikostí obou populací. *P. pratensis* roste na vrcholu kopce, *P. patens* na severozápadním úpatí. Současná velikost populace *P. pratensis* je několik desítek rostlin, *P. patens* 11.

Managementovým opatřením je především vysekávání křovin a sečení trávy (Turoňová et al. 2013).

#### **10. u Líšnice (350 m n. m.)**

GPS souřadnice: 49°53'48.617"s. š., 14°19'52.244"v.d.

Lokalita u Líšnice se nachází mezi obcemi Klínek a Líšnice. Podloží je břidlicové (Balatka et Kalvoda 2006).

Jedná se vlastně o remízek mezi poli. V těsné blízkosti je golfové hřiště.

Porost tvoří ruderalní trávník, který je lemován křovinami. Křoviny se rozšiřují i do travnaté plochy, ale díky spásání vysokou a občasným odstraňování plochu zatím nezarostly (Turoňová et al. 2013). Rostliny jsou po skupinách překryty klecemi proti okusu.

Společná populace *P. patens* a *P. pratensis* se snížila, v současnosti čítá 11 rostlin *P. patens* a několik desítek rostlin *P. pratensis*, hlášený výskyt *P. × hackelii* (Skalický 1997) nebyl potvrzen.

### **11. Křížová hora (590 m n. m.)**

GPS souřadnice: 50°34'8.765" s. š., 14°9'25.550" v. d.

Křížová hora je součástí Labského středohoří, leží nedaleko Litoměřic.

Podloží je z alkalického živce (Balatka et Kalvoda 2006).

Vrch je pokryt smíšeným lesem.

Smíšená populace *P. patens*, *P. pratensis* a *P. × hackelii* na jedné ze skalek pod vrcholem byla považována za vyhynulou, ale byla znovuobjevena Severočeskou pobočkou ČBS v roce 2011 (ústní sdělení K. Nepraš). V současnosti se zde vyskytuje 6 rostlin *P. patens*, 3 rostliny *P. pratensis* a 4 rostliny *P. × hackelii*.

### **12. u Bělé pod Bezdězem (275 m n. m.)**

GPS souřadnice: 50°29'27.699"s. š., 14°50'58.791"v. d.

Lokalita se nachází v Ralsko-bezdězské tabuli, v blízkosti Bělé pod Bezdězem.

Podloží tvoří vápnitý a jílovitý pískovec. Lokalita je obklopena hustým borem.

Je zde popisována velká populace *P. patens* a *P. pratensis*, která se stýkala s populací *P. vernalis* (Bílinský et Žlebčík 2009).

Byli zde popisováni tři hybridy *Pulsatilla × celakovskyana* Domin (rodičovské druhy *Pulsatilla pratensis* subsp. *bohemica* a *Pulsatilla vernalis*), *Pulsatilla × intermedia* Lsch. (rodičovské druhy *Pulsatilla patens* a *Pulsatilla vernalis*) (Petříček et Kolbek 1996) a *Pulsatilla × hackelii*.

Populace *P. patens* a *P. pratensis* i populace *P. vernalis* se ale výrazně zmenšily. Je zde 11 rostlin *P. patens*, 1 rostlina *P. pratensis* a 1 rostlina *P. × hackelii* (Kolbek et Petříček 1996).

Populace je oplocena, ale prosvětlení bylo provedeno jen mírné. Probíhá zde reintrodukce (ústní sdělení J. Žlebčík).

### **13. Holý vrch (496 m n. m.)**

GPS souřadnice: 50°34'47.337"s. š., 14°6'28.497"v. d.

Holý vrch sousedí s vrchem Hradiště. Též se jedná o čedičový vrch (Balatka et Kalvoda 2006) a na vrcholu kopce je stepní společenstvo.

V minulosti zde byly popisovány stovky rostlin obou druhů *P. patens* a *P. pratensis* ve společné populaci a hybrid *P. × hackelii* (Kubát 1997). V současnosti jsou zde asi 150 rostlin *P. pratensis*, které rostou přímo na vrcholu a několik desítek rostlin *P. patens*, které rostou na skalkách pod vrcholem, výskyt *P. × hackelii* zde nebyl potvrzen.

V rámci managementu dochází k vysekávání křovin, sečení trávy a pastvě, pokusně zde byla prováděno vypalování stařiny.

#### **14. úvoz (485 m n. m.)**

GPS souřadnice: 50°34'26.010"s. š., 14°6'50.285"v. d.

Lokalita úvoz se nachází v sedle mezi vrchy Hradiště a Holým vrchem, podél cesty. Podloží je tvořeno čedičem (Balatka et Kalvoda 2006). Porostem je step zarůstající křovinami.

Populace je společnou populací *P. patens* a *P. pratensis*, je zde asi 100 rostlin *P. patens* a 200 rostlin *P. pratensis*.

#### **15. Hradiště (545 m n. m.)**

GPS souřadnice: 50°34'7.620"s. š., 14°6'49.188"v. d.

Vrch Hradiště je součástí Labského středohoří, tyčí se nad obcí Hlinná.

Jedná se o čedičový vrch (Balatka et Kalvoda 2006).

Na větší části Hradiště se nachází step.

V minulosti zde byly popisovány stovky až tisíce rostlin obou druhů *P. patens* a *P. pratensis* ve společné populaci (Domin 1904). Jedná se o typovou lokalitu *P. × hackelii* (Kubát 1997).

V současnosti zde roste asi sto rostlin *P. pratensis* a 1 rostlina *P. patens* na skalách na vrcholu.

Byly zde detekovány také 2 rostliny *P. × hackelii*.

V rámci managementu dochází k vysekávání křovin, sečení trávy a pastvě (Turoňová et al. 2013).

#### **16. Číčov (477 m n. m.)**

GPS souřadnice: 50°27'37.450" s.š., 13°48'7.303" v. d.

Číčov se nachází v Lounském středohoří, nedaleko Hořence.

Podloží je tvořeno pikritickým leucitinem, v jehož puklinách se nacházejí krystaly aragonitu (Balatka et Kalvoda 2006).

Roste na něm několik set rostlin *P. pratensis*, které jsou oproti jiným lokalitám menší, mají téměř výhradně jen jeden květ a listy mají méně úkrojků než u jiných populací.

V rámci managementu jsou vysekávány křoviny a je prováděna pastva (vlastní pozorování).

#### **17. Vendula (200 – 281 m n. m.)**

GPS souřadnice: 50°32'47.418"s. š., 14°3'21.455"v. d.

Vendula leží v Ústeckém středohoří u Velkých Žernosek. Podloží je tvořeno amfibolitem a svorem (Balatka et Kalvoda 2006).

Většina plochy je tvořena stepí, případně lesostepí. V blízkosti je železniční trať a vinice.

Populace *P. pratensis* čítá asi sto rostlin, větší populace je na sousedním vrchu Kalvárie.

#### **18. Bořeň (539 m n. m.)**

GPS souřadnice: 50°31'36.991"s. š., 13°45'43.271"v. d.

Bořeň se nachází v Milešovském středohoří, u Bíliny.

Je to znělcový vrch (Balatka et Kalvoda 2006), na jehož jižním a jihozápadním svahu převládají stepní společenstva. V nich se vyskytuje *P. pratensis*. Jeho populace se ale hodně snížila, v současnosti čítá asi 40 jedinců.

#### **19. Dubový vrch (662 - 691 m n. m.)**

GPS souřadnice: 50°19'45.853"s. š., 13°14'30.930"v. d.

Dubový vrch se nachází v Doupovských horách, na hranicích Vojenského újezdu Hradiště, u býv. obce Zvoníčkov. Podloží tvoří lahary a napadanými tufy (Balatka et Kalvoda 2006).

Vegetaci tvoří step místy zarůstající křovinami.

Je zde společná populace *P. patens* a *P. pratensis*. Jedinců *P. patens* je zde několik set až tisíců, tvoří několik subpopulací, jedinců *P. pratensis* je zde asi 5. Dříve udávaný *P. × hackelii* (Skalický 1997) zde nebyl nalezen.

Celá lokalita je kosena, jsou vysekávány křoviny a strháván drn (Turoňová et al. 2013).

**Příloha 7: Udělené výjimky z ochrany druhů *P. patens* a *P. pratensis* a vyjádření pro jednotlivé oblasti (CHKO České středohoří, Středočeský kraj, Ústecký kraj, Vojenský újezd Hradiště).**



Agentura ochrany přírody a krajiny České republiky  
**SPRÁVA CHRÁNĚNÉ KRAJINNÉ OBLASTI  
ČESKÉ STŘEDOHOŘÍ**

Michalská 260/14  
P.O. BOX 183  
412 01 Litoměřice  
tel.: 416 574 611  
fax: 416 574 610  
cstred@nature.cz  
www.nature.cz

**Dle rozdělovníku  
na doručení**

NAŠE ZNAČKA:	1531/CS//2013	VYŘIZUJE:	Hamerský	V LITOMĚŘICÍCH DNE:	24.5.2013
SPR. ŘÍZENÍ:	SR/0599/2013	SKART. ZNAK:	V10	UKLÁDACÍ ZNAK:	Koniklec otevřený koniklec luční

**Rozhodnutí dle § 56 odst. 1, odst. 2, písm. a) a písm. d) zákona č. 114/1992 Sb., o ochraně přírody a krajiny, ve znění pozdějších předpisů**

k.ú. Boreč u Lovosic - vrch Boreč  
k.ú. Dobřice u Skršína - Dobřice  
k.ú. Hlinná - Hradiště u obce Hlinná, Holý vrch u obce Hlinná  
k.ú. Hořenec - vrch Čičov  
k.ú. Chouč - vrch Bořeň  
k.ú. Kozly - Tobíášův vrch u obce Kozly  
k.ú. Lhotka nad Labem - vrch Lovoš  
k.ú. Oparno - vrch Lovoš  
k.ú. Pnětluky - Třešňovka u Vlastislavi  
k.ú. Raná u Loun - vrch Oblík, vrch Raná  
k.ú. Pohořany - Křížová hora u obce Žitenice  
k.ú. Velké Žernoseky - vrch Vendula  
k.ú. Žitenice - Křížová hora u obce Žitenice

žadatel: Nikol Krejčová (nar. 13. 12. 1988), adresa: Dukelských hrdinů 763/2b,  
400 01 Ústí nad Labem

**Výrok:**

Správa Chráněné krajinné oblasti České středohoří (dále jen „Správa CHKO ČS“) jako příslušný orgán státní správy ochrany přírody a krajiny podle ustanovení § 78 odst. 1 zákona č. 114/1992 Sb., o ochraně přírody a krajiny, ve znění pozdějších právních předpisů (dále také „zákon“), na základě žádosti paní Nikol Krejčové, Dukelských hrdinů 763/2b, 400 01 Ústí nad Labem

A)

**povoluje** dle § 56 odst. 1 a § 56 odst. 2, písm. a) a d) zákona **výjimku** ze základních podmínek ochrany a ze zákazů uvedených v § 49 odst. 1 zákona, konkrétně rušení druhu ve vývoji, sběr rostlin, zásah do biotopu druhu, držení, dopravy rostlin a pěstování



pro kriticky ohrožený druh **koniklec otevřený** (*Pulsatilla patens*) (dále i KOT), který je podle ustanovení § 14 odst. 2 a přílohy č. II vyhlášky č. 395/1992 Sb. a vyhlášky č. 175/2006 Sb. zvláště chráněným druhem a zároveň je druhem uvedeným v přílohách Směrnice Rady ES č. 92/43/EHS o ochraně přírodních stanovišť, volně žijících živočichů a planě rostoucích rostlin (směrnice o stanovištích);

B)

**povoluje** dle § 56 odst. 1 a § 56 odst. 2, písm. a) a d) zákona **výjimku** ze základních podmínek ochrany a ze zákazů uvedených v § 49 odst. 1 zákona, konkrétně rušení druhu ve vývoji, sběr rostlin, zásah do biotopu druhu, držení, dopravy rostlin apěstování pro silně ohrožený druh **koniklec luční** (*Pulsatilla pratensis*) (dále i KOL), který je podle ustanovení § 14 odst. 2 a přílohy č. II vyhlášky č. 395/1992 Sb. a vyhlášky č. 175/2006 Sb. zvláště chráněným druhem.

Výjimka dle odst. A) a B) se povoluje za účelem odběru vzorků o váze 20 mikrogramů, konkrétně listového pletiva (příp. dalších pletiv - odběr z okvětního lístku) a brakteol, tyčinek - pylu) u jedinců vykazujících intermediární charakter mezi koniklem lučním (*Pulsatilla pratensis*) a koniklem otevřeným (*Pulsatilla patens*) - tedy předpokládaných kříženců k. Hackelův (*Pulsatilla x hackelii*) a jejich rodičovských jedinců, dále transferu a držení a pěstování částí rostlin (resp. vzorků) s cílem provedení karyologického rozboru metodou průtokové cytometrie, příp. dalších měření formou klasické morfometrie a formou barvení pylu. Výjimka se povoluje na lokalitách Hradiště u obce Hlinná, Holý vrch u obce Hlinná, Tobiašův vrch u obce Kozly, Křížová hora u obce Žitenice, vrch Boreč, vrch Lovoš, vrch Čičov, vrch Vendula, Třešňovka u Vlastislavi, Dobřčice, vrch Oblík, vrch Raná a vrch Bořeň.

#### **Výjimka se povoluje za splnění těchto podmínek:**

1. Odběr bude proveden z jedinců, vykazujících intermediární charakter (předpokládaný kříženec k. x Hackelův) a z předpokládaných rodičovských populací (předpokládané druhy koniklece lučního (*Pulsatilla pratensis*) a koniklece otevřeného (*Pulsatilla patens*)).
2. Maximální limit odběru vzorků je stanoven na 1 list z jedince. U jedinců, kde bude proveden odběr pouze části listů o hmotnosti do 20 mikrogramů je povolen i odběr části rostliny (okvětní lístek, brakteol, 10 tyčinek).
3. Maximální stanovený limit odběrů vzorků na 1 lokalitě je 30 rostlin.
4. Držitel výjimky vždy do 31.12. příslušného kalendářního roku nahlásí Správě CHKO ČS zásah provedený na základě tohoto rozhodnutí, tj. zda-li byl proveden a v jakém rozsahu. Povinnost hlášení se vztahuje na druhy volně žijících živočichů a rostlin z příloh II., IV. a V. Směrnice Rady ES č. 92/43/EHS, konkrétně na druh koniklec otevřený.
5. Realizací prací je pověřena žadatelka, paní Nikol Krejčová, Dukelských hrdinů 763/2b, 400 01 Ústí nad Labem.
6. Výjimka se povoluje na dobu do 31. 12. 2015.

#### **Odůvodnění:**

Dne 19. 4. 2013 obdržela Správa CHKO ČS podání žádosti paní Nikol Krejčové (narozené 13. 12. 1988), Dukelských hrdinů 763/2b, 400 01 Ústí nad Labem, ve věci povolení výjimky dle § 56 zákona, ze základních podmínek ochrany a ze zákazů, uvedených v § 49 zákona. Důvodem žádosti je provedení prací za účelem výzkumu druhu a jeho následné ochrany na lokalitách Hradiště u obce Hlinná, Holý vrch u obce Hlinná, Tobiašův vrch u obce Kozly, Křížová hora u obce Žitenice, vrch Boreč, vrch Lovoš, vrch Čičov, vrch Vendula, Třešňovka u Vlastislavi, Dobřčice, vrch Oblík, vrch Raná a vrch Bořeň, při které dojde, zásahu do biotopu druhu, držení, dopravě a pěstování částí rostlin (resp. vzorků listů, příp. dalších pletiv (brakteol, tyčinky, okvětní



lístek) u jedinců KOT a KOL, které vykazují hybridní, tedy intermediární znaky) kriticky ohroženého druhu koniklece otevřeného (*Pulsatilla patens*) a silně ohroženého druhu koniklece lučního (*Pulsatilla pratensis*).

Žádost obsahuje:

- Žádost o udělení výjimky ze základních ochranných podmínek zvláště chráněných druhů, konkrétně kriticky ohroženého druhu koniklece otevřeného (*Pulsatilla patens*) a silně ohroženého druhu koniklece lučního (*Pulsatilla pratensis*)

Správa CHKO ČS písemným opatřením ze dne 26. 4. 2013 oznámila známým účastníkům řízení zahájení řízení v této věci, současně oznámila zahájení řízení občanskému sdružení, které uplatnilo u Správy CHKO ČS požadavek na poskytování informací o zahajovaných správních řízeních dle § 70 zákona. Správa CHKO ČS dále určila usnesením z téhož dne dle § 36 odst. 1 a § 39 odst. 1 zákona č. 500/2004 Sb., správní řád, lhůtu pro navrhování důkazů a podávání jiných návrhů. Správa CHKO ČS upustila od ústního jednání a šetření na lokalitách, protože podklady poskytnuté žadatelem obsahují všechny údaje nezbytné pro řádné posouzení žádosti.

Vyzvané Občanské sdružení Společnost ochránců životního prostředí, Nerudova 34, Litoměřice se ke správnímu řízení nepřihlásilo.

Popis vlastního záměru:

Identifikační údaje lokalit:

k.ú. Boreč u Lovosic - vrch Boreč, k.ú. Dobřice u Skršína – Dobřice, k.ú. Hlinná - Hradiště u obce Hlinná, Holý vrch u obce Hlinná, k.ú. Hořenec - vrch Čičov, k.ú. Chouč - vrch Bořeň, k.ú. Kozly - Tobiašův vrch u obce Kozly, k.ú. Lhotka nad Labem - vrch Lovoš, k.ú. Oparno - vrch Lovoš, k.ú. Pnětluky - Třešňovka u Vlastislav, k.ú. Raná u Loun - vrch Oblík a vrch Raná, k.ú. Pohořany - Křížová hora u obce Žitenice, k.ú. Velké Žemoseky - vrch Vendula a k.ú. Žitenice - Křížová hora u obce Žitenice

Výjimka se konkrétně týká rušení druhů ve vývoji odběrem vzorků listů (případně pouze částí listů, brakteolu, tyčinek a okvětního lístku jedinců koniklece otevřeného a koniklece lučního, které vykazují hybridní, intermediární znaky mezi oběma druhy a jejich rodiči. Dále se výjimka týká transferu a držení a pěstování pletiv rostlin. Vlastní terénní odběr vzorků bude proveden z vyznamenaných míst v rámci jmenovaných lokalit.

Druhy KOT a KOL přesto, že jsou zákonem chráněné, jsou stále více mizející druhy. Jedním z faktorů, které ovlivňují populační dynamiku by mohla být podle nových poznatků hybridizace. Cílem práce je zjistit, zda skutečně existuje hybridizace, popsaná roku 1815 a kříženec obou druhů koniklec x Hackelův (*Pulsatilla x hackelii*), nebo zda se jedná pouze o příklad velké variability obou druhů konikleců. Oba druhy se dají odlišit pouze na základě rozdílné velikosti genomu. K určení genomu je nejvhodnější a již vyzkoušená (př. hvozdík písečný) cytogenetická metoda – průtoková cytometrie (provedení karyologického screeningu), na jejímž základě bude možné stanovit a zhodnotit dynamiku jednotlivých populací. Jedná se o nedestruktivní metodu při níž stačí odběr pouze malé části listu (cca 20 mikrogramů listového pletiva). Karyologický screening bude proveden pouze u těch jedinců, které vykazují intermediární charakter mezi koniklem otevřeným a k. lučním - obecně nazývané jako kříženec obou druhů - koniklec x Hackelův (*Pulsatilla x hackelii*). Výstupem práce bude kritické zhodnocení dynamiky jednotlivých populací včetně frekvence a dynamiky mezidruhové hybridizace a stanovení potenciálního rizika genetické eroze obou druhů konikleců. Pro další praktické využití těchto poznatků pro zhodnocení rozdílnosti fenotypů rodičovských druhů a hybrida je nejlepší metou klasická morfometrika. Ta bude provedena na listu, resp. jednom okvětním lístku, brakteolu. Kvalita pylových zrn bude sledována metodou „barvení pylu“ za odběru několika tyčinek z 1 květu rostliny a



následného pozorování kvality nabarvených pylových zrn. Vzorky budou odebírány pouze u populací bvykazujících hybridní charakter v max. množství 30 rostlin v rámci 1 lokality.

Výjimka se konkrétně týká rušení druhů ve vývoji odběrem vzorků částí listů, dále jejich transferu, držení a pěstování pletiv rostlin. Odběr bude proveden z vytipovaných míst v rámci lokalit, maximálně u 30 jedinců.

Vzhledem k tomu, že žadatelka bude odebírat vzorky pouze u jedinců s intermediárním charakterem, je zde velká pravděpodobnost že půjde o kříženec koniklece x Hackelův (tak jak byl původně popsán v roce 1815). Tyto rostliny jsou považovány ve smyslu zákona za křížence a nejsou uvedeny v ustanovení § 14 odst. 2 a přílohy č. II vyhlášky č. 395/1992 Sb. a vyhlášky č. 175/2006 Sb. jako „druh zvláště chráněný“. Zároveň není druhem uvedeným v přílohách Směrnice Rady ES č. 92/43/EHS o ochraně přírodních stanovišť, volně žijících živočichů a planě rostoucích rostlin (směrnice o stanovištích). Tímto tedy dojde k další redukci možnosti poškození zvláště chráněných druhů rostlin (podmínka roznutí č. 1).

Další případné potencionální riziko poškození rostlin je sníženo podmínkami rozhodnutí č. 2 (stanovení maximálního odběru na vzorků v rámci jedné rostliny) a č. 3 (stanovení maximálního limitu odběrů vzorků v rámci 1 lokality). Dodržením stanovených limitů pro odběr nedojde k destrukci, poškození ani újmě na populacích jak koniklece otevřeného, tak koniklece lučního.

Cílem průzkumu je zjištění stavu populací, jejich genetické variability a možné genetické eroze vlivem hybridizace - tím dojde ke zjištění nutných informací k zajištění další ochrany druhu nejen v rámci CHKO Českého středohoří, ale i ČR. Z hlediska zájmů ochrany přírody jde o projekt, který je nutno považovat za velmi důležitý pro vývoj dalších znalostí o konikleci otevřeném, konikleci lučním českém i o kříženci k. x Hackelově.

Žadatelka se problematikou konikleců a jejich hybridizace zabývá již delší dobu (články v odborných časopisech) př.: Krejčová N., Urfus T., Suda J. (2011): „Jak častý je hybridní koniklece Hackelův?“, Živa, pp. 159-160, 4/2011, Praha.

#### Vypořádání návrhů účastníků řízení:

Občanské sdružení Společnost ochránců životního prostředí bylo vyzváno k účasti řízení, ale ve stanoveném termínu se do řízení nepřihlásilo.

Žádný další z účastníků řízení dle § 27 odst. 2 zákona č. 500/2004 Sb., správní řád (obce) neuplatnil jakékoli připomínky, které by mohly být zahrnuty do podmínek rozhodnutí.

Dle § 56 odst. 1 zákona výjimky ze zákazů u památných stromů a zvláště chráněných druhů rostlin a živočichů podle § 46 odst. 2, § 49 a 50 v případech, kdy jiný veřejný zájem převažuje nad zájmem ochrany přírody, nebo v zájmu ochrany přírody, povoluje orgán ochrany přírody. U zvláště chráněných druhů rostlin a živočichů, které jsou předmětem ochrany podle práva Evropských společenství, lze výjimku podle věty první povolit jen tehdy, pokud je dán některý z důvodů uvedených v odstavci 2, neexistuje jiné uspokojivé řešení a povolovaná činnost neovlivní dosažení či udržení příznivého stavu druhu z hlediska ochrany.

V tomto případě se výjimka týká § 56 odst. 2, písm. a) a d) zákona, konkrétně pro účely výzkumu druhu za účelem jeho další ochrany. Dalšími podmínkami jsou neexistence jiného uspokojivého řešení a udržení populací daných druhů v příznivém stavu z hlediska ochrany.



V případě posuzovaného záměru dojde k zásahu do biotopu 2 druhů chráněných zákonem (koniklec otevřený a koniklec luční) a 1 druhu (koniklec otevřený), který je rovněž předmětem ochrany podle práva Evropských společenství. Správa CHKO ČS tedy v průběhu správního řízení posoudila, zda jiný veřejný zájem (tedy realizace předmětného záměru) převažuje v případě všech posuzovaných druhů nad zájmem ochrany přírody. Správa CHKO ČS konstatuje, že v daném případě veřejný zájem v rámci „Mezidruhově hybridizace *Pulsatilla patens* a *Pulsatilla pratensis* – význam pro druhovou ochranu.“ Cílem práce je zjištění skutečné hodnoty mezidruhově hybridizace a možnosti eroze genetického materiálu 2 zvláště chráněných druhů rostlin (z toho jedné rostliny která je rovněž předmětem ochrany podle práva Evropských společenství). Zjištění těchto hodnot je evidentně přímo v zájmu ochrany přírody. Původní rostliny druhů koniklec otevřený a koniklec luční jsou v rámci CHKO České středohoří i ČR relativně vzácné (v případě koniklece otevřeného velmi vzácné s velmi limitovaným množstvím lokalit i jedinců v nich).

Jak vyplývá ze žádosti i ze zkušeností z obdobných prací v minulosti, nedojde realizací záměru k zásahu do unikátních lokalit výskytu. V případě lokalit Hradiště u Hlinné a Holý vrch u Hlinné práce na studii probíhala již od roku 2012 (v rámci výjimky Správy CHKO ČS č.j. SR/0013/CS/2012). Podmínky, stanovené CHKO ČS byly plněny.

Druh koniklec otevřený je navíc předmětem ochrany podle práva Evropských společenství, je Správa CHKO ČS povinna posoudit, zda je v daném případě dán některý z důvodů uvedených v § 56 odst. 2 zákona, zda existuje jiné uspokojivé řešení a zda povolená činnost neovlivní dosažení či udržení příznivého stavu z hlediska ochrany. Dle názoru Správy CHKO ČS dojde realizací záměru zpracování studie k vyjasnění problematiky mezidruhově hybridizace těchto 2 druhů a zjištění hladiny možnosti genetické eroze druhu koniklec otevřený, čímž dojde k naplnění podstaty § 56 odst. 2 písm. a) zákona v zájmu ochrany planě rostoucích rostlin a písm. d) pro účely výzkumu. Daná varianta, tedy provedení realizace studie je nejvhodnější variantou a ostatní řešení nelze považovat za uspokojivá. Jak již bylo uvedeno výše, povolená činnost neovlivní dosažení či udržení příznivého stavu ochrany dotčených druhů. Stanovenými podmínkami pro odběr vzorků dojde k další redukci možnosti případného poškození KOT. Odběru vzorků bude probíhat pouze u rostlin vykazujících intermediární charakter. Odběr listových pletiv je stanoven na max. množství 1 ks listu na 1 rostlinu (příp. odběr více částí rostlin za podmínky limitu odběrů vzorku listu do 20 mikrogramů). Jedná se o velmi malé množství, které rostlinu prakticky nijak negativně neovlivní jak udržení příznivého stavu populace, tak samotnou existenci ohroženého druhu.

Nedodržení stanovených podmínek může být důvodem ke zrušení rozhodnutí podle § 84 odst. 1, písm. c) zákona. Toto rozhodnutí nenahrazuje souhlasy a povolení podle jiných předpisů.

Podle § 56 zákona lze výjimku ze základních ochranných podmínek zvláště chráněných druhů rostlin povolit pouze pokud převažuje veřejný zájem nad zájmem ochrany přírody, v tomto případě podle § 56 odst. 2, písm. a) a d) zákona, konkrétně pro účely výzkumu druhu za účelem jeho další ochrany. Dalšími podmínkami jsou neexistence jiného uspokojivého řešení a udržení populací daných druhů v příznivém stavu z hlediska ochrany.

Vzhledem k tomu, že během prací žadate na projektu dojde k porušení základních ochranných podmínek stanovených v ustanovení § 56 zákona, stanovil správní orgán závazné podmínky výroku rozhodnutí, které budou negativní vlivy minimalizovat. Dodržení stanovených podmínek rozhodnutí umožní další existenci druhu na lokalitě a udržení jejich populací v příznivém stavu z hlediska ochrany. Při rozhodování ve věci a stanovení podmínek rozhodnutí vycházel správní orgán především ze skutečnosti, že neexistuje jiné uspokojivé řešení, jehož prostřednictvím by bylo možné dosáhnout zvýšení a stabilizace populací druhu na lokalitě.



V případě posuzovaného záměru dojde k zásahu do biotopu 2 druhů chráněných zákonem (koniklec otevřený a koniklec luční) a 1 druhu (koniklec otevřený), který je rovněž předmětem ochrany podle práva Evropských společenství. Správa CHKO ČS tedy v průběhu správního řízení posoudila, zda jiný veřejný zájem (tedy realizace předmětného záměru) převažuje v případě všech posuzovaných druhů nad zájmem ochrany přírody. Správa CHKO ČS konstatuje, že v daném případě veřejný zájem v rámci „Mezidrukové hybridizace *Pulsatilla patens* a *Pulsatilla pratensis* – význam pro druhovou ochranu.“ Cílem práce je zjištění skutečné hodnoty mezidrukové hybridizace a možnosti eroze genetického materiálu 2 zvláště chráněných druhů rostlin (z toho jedné rostliny která je rovněž předmětem ochrany podle práva Evropských společenství). Zjištění těchto hodnot je evidentně přímo v zájmu ochrany přírody. Původní rostliny druhů koniklec otevřený a koniklec luční jsou v rámci CHKO České středohoří i ČR relativně vzácné (v případě koniklece otevřeného velmi vzácné s velmi limitovaným množstvím lokalit i jedinců v nich).

Jak vyplývá ze žádosti i ze zkušeností z obdobných prací v minulosti, nedojde realizací záměru k zásahu do unikátních lokalit výskytu. V případě lokalit Hradiště u Hlinné a Holý vrch u Hlinné práce na studii probíhala již od roku 2012 (v rámci výjimky Správy CHKO ČS č.j. SR/0013/CS/2012). Podmínky, stanovené CHKO ČS byly plněny.

Druh koniklec otevřený je navíc předmětem ochrany podle práva Evropských společenství, je Správa CHKO ČS povinná posoudit, zda je v daném případě dán některý z důvodů uvedených v § 56 odst. 2 zákona, zda existuje jiné uspokojivé řešení a zda povolovaná činnost neovlivní dosažení či udržení příznivého stavu z hlediska ochrany. Dle názoru Správy CHKO ČS dojde realizací záměru zpracování studie k vyjasnění problematiky mezidrukové hybridizace těchto 2 druhů a zjištění hladiny možností genetické eroze druhu koniklec otevřený, čímž dojde k naplnění podstaty § 56 odst. 2 písm. a) zákona v zájmu ochrany planě rostoucích rostlin a písm. d) pro účely výzkumu. Daná varianta, tedy provedení realizace studie je nejvhodnější variantou a ostatní řešení nelze považovat za uspokojivá. Jak již bylo uvedeno výše, povolovaná činnost neovlivní dosažení či udržení příznivého stavu ochrany dotčených druhů. Stanovenými podmínkami pro odběr vzorků dojde k další redukci možnosti případného poškození KOT. Odběru vzorků bude probíhat pouze u rostlin vykazujících intermediární charakter. Odběr listových pletiv je stanoven na max. množství 1 ks listu na 1 rostlinu (příp. odběr více částí rostlin za podmínky limitu odběrů vzorku listu do 20 mikrogramů). Jedná se o velmi malé množství, které rostlinu prakticky nijak negativně neovlivní jak udržení příznivého stavu populace, tak samotnou existenci ohroženého druhu.

Nedodržení stanovených podmínek může být důvodem ke zrušení rozhodnutí podle § 84 odst. 1, písm. c) zákona. Toto rozhodnutí nenahrazuje souhlas a povolení podle jiných předpisů.

Podle § 56 zákona lze výjimku ze základních ochranných podmínek zvláště chráněných druhů rostlin povolit pouze pokud převažuje veřejný zájem nad zájmem ochrany přírody, v tomto případě podle § 56 odst. 2, písm. a) a d) zákona, konkrétně pro účely výzkumu druhu za účelem jeho další ochrany. Dalšími podmínkami jsou neexistence jiného uspokojivého řešení a udržení populací daných druhů v příznivém stavu z hlediska ochrany.

Vzhledem k tomu, že během prací žadate na projektu dojde k porušení základních ochranných podmínek stanovených v ustanovení § 56 zákona, stanovil správní orgán závazné podmínky výroku rozhodnutí, které budou negativní vlivy minimalizovat. Dodržení stanovených podmínek rozhodnutí umožní další existenci druhu na lokalitě a udržení jejich populací v příznivém stavu z hlediska ochrany. Při rozhodování ve věci a stanovení podmínek rozhodnutí vycházel správní orgán především ze skutečnosti, že neexistuje jiné uspokojivé řešení, jehož prostřednictvím by bylo možné dosáhnout zvýšení a stabilizace populací druhu na lokalitě.



Směrnice Rady ES č. 79/409/EHS o ochraně volně žijících ptáků (směrnice o ptácích) v čl. 9 odst. 3 a v čl. 12 odst. 1 a Směrnice Rady ES č. 92/43/EHS o ochraně přírodních stanovišť, volně žijících živočichů a planě rostoucích rostlin (směrnice o stanovištích) v čl. 16 odst. 2 ukládají povinnost pravidelně podávat informace o provádění opatření přijatých dle těchto směrnic. Uvedený požadavek byl do národní legislativy implementován v podobě ustanovení § 45f odst. 1 zákona, který orgánům ochrany přírody ukládá mj. sledování stavu evropsky významných druhů. Povinnost hlášení stanovená § 45f zákona je zařazena do výroku rozhodnutí jako podmínka č. 3.

Z uvedených skutečností vyplývá, že povolení výjimky ze zákazů u zvláště chráněného druhu rostliny je vlastním veřejným zájmem, kterým je výzkum druhu ve prospěch jeho další ochrany, tedy ochrana přírody. Z uvedených důvodů orgán ochrany přírody rozhodl tak, jak je uvedeno ve výroku rozhodnutí.

Nedodržení stanovených podmínek může být podle § 84 odst. 1, písm. c) zákona důvodem k odnětí výjimky. Tato výjimka nenahrazuje souhlasy a povolení podle jiných předpisů.

#### Podklady pro rozhodnutí:

- žádost o udělení výjimky ze základních podmínek ochrany KOT a KOL (žadatelka paní Nikol Krejčová), ze dne 19. 4. 2013.
- dobropis k žádosti paní Nikol Krejčové od Univerzity Karlovy, Přírodovědecké fakulty, Katedry botaniky, Benátská 2, 128 01 Praha 2, konkrétně od pana Doc. RNDr. Jana Sudy, PhD. ze dne 20. 3. 2013 (doručeno spolu se žádostí dne 19. 4. 2013)
- Správa CHKO ČS: „Plán péče o PP Hradiště“ na období let 2004 – 2013, dep. Archiv Správy CHKO ČS, Litoměřice.
- Správa CHKO ČS: „Plán péče o PR Holý vrch u Hlinné“ na období let 2004 – 2013, dep. Archiv Správy CHKO ČS, Litoměřice.
- Správa CHKO ČS: „Plán péče o PR Čičov“ na období let 2004 – 2013, dep. Archiv Správy CHKO ČS, Litoměřice.
- Správa CHKO ČS: „Plán péče o PP Tobiášův vrch“ na období let 2004 – 2013, dep. Archiv Správy CHKO ČS, Litoměřice.
- Krejčová N., Urfus T., Suda J. (2011): „Jak častý je hybridní koniklec Hackelův ?“, Živa, pp. 159-160, 4/2011, Praha.
- Kubát K., Hrouda L., Chrtek J. jun., Kaplan Z., Kirschner J et Štěpánek J (eds.) (2002): Klíč ke květeně České republiky – 928 p., Academia, Praha.
- Marhoul P., Turoňová D. (eds.) (2008): Zásady managementu stanovišť druhů v Evropsky významných lokalitách soustavy Natura 2000. Metodika AOPK ČR. . vyd. – Praha: Agentura ochrany přírody a krajiny ČR. – 161 s.
- Moravec J. a kol. (1995): Rostlinná společenstva České republiky a jejich ohrožení. 2. přepracované a doplněné vydání – 206 p., OVM v Litoměřicích, Sč. Pobočka ČBS v Ústí n.L. a BÚ AV ČR Průhonice, Litoměřice.



- Procházka F. (ed.) (2001): Černý a červený seznam cévnatých rostlin České republiky (stav v roce 2000). - Příroda, Praha, 18:1-166.

- Rozhodnutí dle § 56 ZOPK (koniklec otevřený koniklec luční 2012), vydala Správa CHKO České středohoří dne 7. 6. 2012, č.j.: SR/0020/2012.

#### Poučení o odvolání:

Proti tomuto rozhodnutí lze podat odvolání do 15-ti dnů od jeho doručení k Ministerstvu životního prostředí, a to podáním učiněným u Správy CHKO České středohoří v Litoměřicích v počtu 4 kusů stejnopisů. Včas podané odvolání má odkladný účinek.

V odvolání se uvede, v jakém rozsahu se rozhodnutí napadá, v čem je spatřován rozpor s právními předpisy, nesprávnost rozhodnutí nebo řízení, jež mu předcházelo. Odvolání jen proti odůvodnění rozhodnutí je nepřipustné.



Digitálně podepsal RNDr.  
Jaroslav Obermajer  
DN: C=CZ, O=Agentura ochrany přírody a  
krajiny ČR [IČ 62933591],  
OU=CHKO České  
středohoří, OU=51036,  
CN=RNDr. Jaroslav  
Obermajer, serialNumber=P151913,  
title=Vedoucí  
Důvod: Schvaluji tento dokument  
Umístění: Správa CHKO České středohoří  
Kontakt:  
Datum: 05.06.2013 15:02:55

*RNDr. Jaroslav Obermajer*

VEDOUcí SPRÁVY

#### Rozdělovník:

Obdrží účastníci řízení dle § 27 odst. 1 zákona č. 500/2004 Sb, správní řád:  
Nikol Krejčová, Dukelských hrdinů 763/2b, 400 01 Ústí nad Labem

Obdrží účastníci řízení dle § 27 odst. 2 zákona č. 500/2004 Sb, správní řád:  
Obec Hlinná, č.p. 53, 412 01 Hlinná  
Obec Kozly, Kozly 19, 440 01 Louny  
Obec Žitenice, Pohořanská 118, 411 41 Žitenice  
Obec Velemín, č.p. 96, 411 31 Velemín  
Obec Lhotka nad Labem, Lhotka nad Labem 22, 410 02 Lovosice  
Obec Libčeves, K Zámku 1, 439 26 Libčeves  
Obec Raná, Raná 114, 439 24 Raná u Loun  
Obec Hrobčice, Hrobčice 41, 417 57 Hrobčice  
Obec Skršín, Skršín 48, 434 01 Most  
Obec Podsedice, Podsedice 25, 411 15 Podsedice  
Obec Velké Žernoseky, Velké Žernoseky 63, 412 01 Litoměřice



Na vědomí:

Doc. RNDr. Jan Suda, PhD., katedra botaniky PřF UK v Praze, Benátská 2, 128 01 Praha 2  
ČIŽP, Oblastní inspektorát Ústí nad Labem, Výstupní 1644, 400 07 Ústí nad Labem

IČO: 62933591  
DS: 6npdyiv

Bankovní spojení ČNB Praha 1  
číslo účtu: 18228-011/0710

roman.hamersky@nature.cz  
tel.: 416 574 617



Praha: 9.9.2013  
Číslo jednací: 133124/2013/KUSK  
Spisová značka: SZ\_116108/2013/KUSK/3  
Vyřizuje: Vaňhát I.776  
Značka: OŽP/Vn

Dle rozdělovníku

**Věc: rozhodnutí ve věci povolení výjimky ze zákazů u zvláště chráněných druhů rostlin**  
***Pulsatilla patens* subsp. *patens* a *P. pratensis* subsp. *bohemica***

## ROZHODNUTÍ

Krajský úřad Středočeského kraje, odbor životního prostředí a zemědělství (dále jen krajský úřad) kompetentní podle ust. § 77a odst. 5 písm. h) zákona ČNR č. 114/1992 Sb., o ochraně přírody a krajiny, ve znění pozdějších předpisů (dále jen zákon č. 114/1992 Sb.), v souladu s ust. § 29 odst. 1) zákona č. 129/2000 Sb., o krajích, ve znění pozdějších předpisů a na základě správního řízení vedeného podle zákona č. 500/2004 Sb., správní řád, ve znění pozdějších předpisů (dále jen správní řád),

### vydává povolení

podle § 56 odst. 2 písm. a) zákona č. 114/1992 Sb., Bc. Nikol Krejčové (Dukelských hrdinů 763/2B, 400 01 Ústí nad Labem, dat. nar. 13.12.1988) k poškozování jedinců a sběr částí jedinců silně ohroženého druhu *Pulsatilla pratensis* subsp. *bohemica* a kriticky ohroženého *Pulsatilla patens* subsp. *patens* za účelem studia dynamiky jejich populací a ohrožení hybridizací. Výjimka je povolována do roku 2015 na pozemcích parc.č. 238 a 232 dle KN v k.ú. Líšnice a pozemcích parc.č. 377 a 379 v k.ú. Čistá u Mladé Boleslavi.



## Podmínky rozhodnutí:

- Výzkumné práce budou probíhat dle metodiky popsané v padané žádosti předcházející tomuto rozhodnutí, tak aby byly maximálně šetřeni jedinci obou uvedených druhů i jejich biotop.

Účastníkem řízení ve smyslu ustanovení § 27 odst. 1 zákona 500/2004 Sb., je Bc. Nikol Krejčová (Dukelských hrdinů 763/2B, 400 01 Ústí nad Labem, dat. nar. 13.12.1988)

## O d ů v o d n ě n í

Krajský úřad obdržel dne 31.7.2013 pod č.j. 116108/2013/KUSK žádost Bc.Nikol Krejčové (Dukelských hrdinů 763/2B, 400 01 Ústí nad Orlicí) o povolení výjimky ze zákazu uvedených u zvláště chráněných druhů dle ust. § 49 zákona č. 114/1992 Sb. Předmětem žádosti bylo konkrétně poškozování jedinců a sběr části jedinců silně ohroženého druhu *P.pratensis* subsp. *bohémica* a kriticky ohroženého *P.patens* subsp. *Patens*, za účelem studia dynamiky jejich populací a ohrožení hybridizací. Výjimka byla požadována na období dvou let na pozemcích parc.č. 238 a 232 dle KN v k.ú. Líšnice a pozemcích parc.č. 377 a 379 v k.ú. Čistá u Mladé Boleslavi. Výzkum bude spočívat v rozlišení genomu obou druhů a jejich křížence pomocí průtokové cytometrie, pro niž bude odebíráno 20 µg listového pletiva. Odběr pletiva bude prováděn obezřetně a nepoškodí testované jedince. Dále bude porovnáván fenotyp rodičovských druhů a hybrida pomocí měření jednoho okvětního lístku a kousku brakteolu u sledovaných jedinců. Při odběru okvětního lístku a části brakteolu bude opět postupováno s maximální opatrností, tak aby nedošlo k poškození zkoumaných rostlin. Poslední metodou hodnotící fertilitu, bude barvení pilu na několika odebraných tyčinkách z jednoho květu zkoumané rostliny (odběr maximálně ze 30 rostlin z jedné lokality). Metoda barvení pilu opět nepředstavuje ohrožení pro testované jedince.

Výstupy práce budou zpřístupněny orgánům ochrany přírody pro možnou aplikaci v praktické ochraně těchto druhů.



V průběhu správního řízení neobdržel Krajský úřad žádné stanovisko ani návrh. Vzhledem k tomu, že požadovaný výzkum představuje praktickou možnost odhalení příčin ohrožení jmenovaných druhů bylo rozhodnuto tak, jak je uvedeno ve výroku.

### **Poučení o odvolání:**

Proti tomuto rozhodnutí se lze odvolat k Ministerstvu životního prostředí ČR podáním učiněným u Krajského úřadu Středočeského kraje, odboru životního prostředí a zemědělství do 15-ti dnů od jeho oznámení.

.....  
oprávněná úřední osoba

*Pavel Vaňhát*

referent oddělení ochrany

*přírody a krajiny*

„otisk úředního razítka“

### **Rozdělovník:**

#### **Obdrží na doručence – účastníci řízení:**

- Bc.Nikol Krejčová, Dukelských hrdinů 763/2B, 400 01 Ústí nad Orlicí
- Obec Líšnice, Líšnice 175, 252 10 Mníšek pod Brdy
- Obec Čistá, Čistá 195, 294 23 Mladá Boleslav



# Krajský úřad Ústeckého kraje

Velká Hradební 3118/48, 400 02 Ústí nad Labem  
odbor životního prostředí a zemědělství

dle rozdělovníku

Datum: 22. 7. 2013  
JID: 99695/2013/KUUK  
Jednací číslo: 1666/ZPZ/2013-4/ZD-582/SU-036  
E-mail/linka: rothanzl.j@kr-ustecky.cz / 121

**Rozhodnutí v řízení o vydání souhlasu k činnostem vymezeným v bližších ochranných podmínkách Přírodní památky Krásná Lípa dle § 44 odst. 3 zákona č. 114/1992 Sb., o ochraně přírody a krajiny, v platném znění, a ve věci povolení výjimky ze zákazů dle § 56 citovaného zákona**

## ROZHODNUTÍ

Krajský úřad Ústeckého kraje, odbor životního prostředí a zemědělství, na základě žádosti podané dne 18. 4. 2013 Bc. Nikol Krejčovou o A) vydání souhlasu k činnostem vymezeným v bližších ochranných podmínkách Přírodní památky Krásná Lípa dle § 44 odst. 3 zákona č. 114/1992 Sb., o ochraně přírody a krajiny, v platném znění (dále jen zákon), a o B) povolení výjimky k zásahům do přirozeného vývoje zvláště chráněných druhů rostlin dle § 56 zákona, ze zákazů uvedených v § 49 zákona, a to druhů koniklec otevřený (*Pulsatilla patens*) a koniklec luční (*Pulsatilla pratensis*) uvedených v přílohách č. II vyhlášky MŽP ČR č. 395/1992 Sb., ve znění pozdějších předpisů, a to z důvodu výzkumu „Mezidruhovná hybridizace *Pulsatilla patens* a *Pulsatilla pratensis* - význam pro druhovou ochranu“ ve správním obvodu obcí Kadaň a Křimov, vydává toto rozhodnutí.

## VÝROK

Krajský úřad Ústeckého kraje, odbor životního prostředí a zemědělství, jako orgán státní správy ochrany přírody a krajiny příslušný dle ustanovení § 77a odst. 4 písm. j) a odst. 5 písm. h) zákona č. 114/1992 Sb., o ochraně přírody a krajiny, v platném znění (dále jen zákon),

**A) vydává** Bc. Nikol Krejčové, Dukelských Hrdinů 763/28, Ústí nad Labem 400 01, dat. nar. 13. 12. 1988 **souhlas** v souladu s § 44 odst. 3 zákona a s bližšími ochrannými podmínkami vymezenými v čl. 2 písm. a) Vyhlášky Okresního úřadu v Chomutově ze dne 25. května 1992, kterou se určuje chráněný přírodní výtvar „Krásná Lípa“ **se vstupem** do přírodní památky Krásná Lípa. Vstup na území přírodní památky je umožněn po dobu nezbytně nutnou pro výzkum, nejdéle však do 31. 12. 2018.

**B) povoluje** v souladu s § 56 odst. 1 a 2 písm. a) a d) Bc. Nikol Krejčové, Dukelských Hrdinů 763/28, Ústí nad Labem 400 01, dat. nar. 13. 12. 1988 **v ý j i m k u** ze zákazů ze základních ochranných podmínek zvláště chráněných druhů rostlin chráněných dle § 49 zákona, a to pro druhy: **koniklec otevřený (*Pulsatilla patens*) a koniklec luční (*Pulsatilla pratensis*)**. Koniklec otevřený (*Pulsatilla patens*) je druhem, který je předmětem ochrany podle práva Evropských společenství.

Tel.: +420 475 657 111

Fax: +420 475 200 245

Url: [www.kr-ustecky.cz](http://www.kr-ustecky.cz)

E-mail: [urad@kr-ustecky.cz](mailto:urad@kr-ustecky.cz)

strana 1 / 3



Výjimka se povoluje ze zákazu sběru, trhání, poškozování a rušení ve vývoji; držení a dopravování; v souvislosti s realizací záměru „Mezidruková hybridizace *Pulsatilla patens* a *Pulsatilla pratensis* - význam pro druhovou ochranu“, a to za splnění následujících podmínek:

- B1. Výzkum bude prováděn dle v žádosti předložené metodiky, tj. bude prováděn na lokalitách: Dubový vrch, Přírodní památka Krásná Lípa, Prostřední vrch u Kadaně a lokalitě v blízkosti zaniklého sídla Pastviny; odebírané vzorky pro cytometrii, morfometrii, barvení pylu budou odebrány u všech hybridů a maximálně třiceti rostlin koniklece otevřeného a třiceti rostlin koniklece lučního.
- B2. S ohledem na dosavadní demografické sledování populace koniklece otevřeného v Přírodní památce Krásná Lípa, budou vzorky zde odebrané označeny tak, aby bylo určitelné z jaké rostliny byly odebrány. V případě chybějícího stávajícího označení rostlin v terénu budou ty rostliny, z nichž budou odebrány vzorky v terénu jednoznačně označeny.
- B3. Výsledky výzkumu budou po jejich zpracování zaslány na Krajský úřad Ústeckého kraje (včetně případných následných publikací).
- B4. Výjimka se povoluje na dobu výzkumu nejdéle však do 31. 12. 2018.

Účastníci řízení dle § 27 odst. 1 správního řádu

Bc. Nikol Krejčová, Dukelských Hrdinů 763/28, Ústí nad Labem 400 01, dat. nar. 13. 12. 1988

## ODŮVODNĚNÍ

Dne 18. 4. 2013 podala fyzická osoba Bc. Nikol Krejčová na Krajský úřad Ústeckého kraje žádost o vydání souhlasu dle § 44 odst. 3 zákona k činnosti v Přírodní památce Krásná Lípa, a to ke vstupu ve vegetační sezóně s ohledem na bližší ochranné podmínky přírodní památky a o povolení výjimky dle § 56 zákona ze zákazů ze základních podmínek ochrany zvláště chráněných druhů rostlin koniklece otevřený (*Pulsatilla patens*) a koniklece luční (*Pulsatilla pratensis*) v souvislosti s výzkumem nazvaným „Mezidruková hybridizace *Pulsatilla patens* a *Pulsatilla pratensis* - význam pro druhovou ochranu“. Dnem podání žádosti bylo zahájeno správní řízení ve věci, které správní orgán spolu s usnesením o spojení řízení oznámil opatřením č. j. 1666/ZPZ/2013-3/ZD-582/SU-036 ze dne 16. 5. 2013. Obeslaná občanská sdružení se do řízení nepřihlásila.

Záměrem žadatelky je provedení výzkumu hybridizace výše uvedených druhů, a to pomocí sběru cca. 20 µg listového pletiva pro karyologický screening průtokovou cytometrií; sběru jednoho listu, jednoho okvětního lístku a části brakteolu pro morfometrická měření; sběru několika tyčinek s prašníky pro barvení pylu. To vše u všech nalezených hybridních rostlin koniklece hackelova (*Pulsatilla x hackelii*) na lokalitě a do třiceti jedinců od koniklece lučního a k. otevřeného na lokalitách Dubový vrch, Přírodní památka Krásná Lípa, Prostřední vrch u Kadaně a lokalitě koniklece otevřeného u bývalé osady Pastviny (k. ú. Kadaň, Krásná Lípa u Křimova, Pastviny a Úhošťany). Tyto metodikou předpokládané úkony byly přejaty do podmínek rozhodnutí, jako maximální povolené.

Vstup do přírodní památky je jejím zřizovacím předpisem omezen. S ohledem na účel a metodiku výzkumu nelze nicméně předpokládat její významné negativní ovlivnění, a proto byl vydán kladný souhlas se vstupem.

Jedná se o základní výzkum s možným následným využitím při ochraně těchto druhů, proto byla podmínkou B3 stanovena povinnost po zpracování výzkumu zaslat výsledky na Krajský úřad Ústeckého kraje. Předpokládaná forma je přitom diplomová práce či publikace ve vědeckém časopise či monografii v elektronické či listinné formě.



Vzhledem k průběžným demografickým sledováním, které v Přírodní památce Krásná Lípa provádí Ing. Čestmír Ondráček z Chomutovského muzea, doporučujeme výzkum na této lokalitě s ním předem konzultovat. Zároveň správní orgán stanovil podmínku B2 s cílem potencionální využitelnosti získaných dat i s ohledem na dosavadní sledování.

Souhlas se vstupem i povolení výjimky je možné využít do konce roku 2018.

S ohledem na důraz na šetrnost při sběru rostlinného materiálu a jeho pouze omezené množství by záměr neměl mít žádný příp. jen velmi slabý přímý vliv na populace druhů. Naopak výsledky výzkumu by mohly umožnit cíleněji a efektivněji tyto druhy podpořit, a proto sledává orgán ochrany přírody záměr účelným a s pozitivními důsledky.

Správní orgán dospěl k názoru, že dopad záměru na biotop a chráněné druhy je přímo ani nepřímo neohroží způsobem, který by vedl k jejich zániku či ohrožení populace a ekosystému, jehož je součástí, přičemž není správnímu orgánu známo jiné uspokojivé řešení, a že je naplněno ustanovení § 56 odst. 1 a 56 odst. 2 písm. a) a d) zákona, kdy je možné povolit výjimku ze základních podmínek ochrany zvláště chráněných rostlin chráněných dle § 49 zákona, a to v tomto případě v zájmu ochrany přírody, neboť je zájmem ochrany přírody účinně ohrožené druhy podporovat, což je možné jedině s dostatečným zdrojem informací získaných základním výzkumem. Zároveň lze konstatovat, že povolovaná činnost neovlivní dosažení či udržení příznivého stavu populací druhů.

Nedodržení stanovených podmínek může být důvodem ke zrušení či změně rozhodnutí podle § 84 odst. 1 písm c) zákona.

## POUČENÍ

Proti tomuto rozhodnutí mohou účastníci řízení podat podle § 81 správního řádu odvolání, ve kterém se uvede v jakém rozsahu se rozhodnutí napadá a dále namítaný rozpor s právními předpisy nebo nesprávnost rozhodnutí nebo řízení, jež mu předcházelo, ve lhůtě 15 dnů ode dne jeho oznámení, a to k Ministerstvu životního prostředí, podáním učiněným u Krajského úřadu Ústeckého kraje, odboru životního prostředí a zemědělství. Za počátek lhůty se považuje den následující po dni oznámení tohoto rozhodnutí, nejpozději však po uplynutí desátého dne ode dne, kdy bylo nedoručené a uložené rozhodnutí připraveno k vyzvednutí.

„otisk úředního razítka“

**RNDr. Tomáš Burian**

vedoucí oddělení životního prostředí

### Rozdělovník

**Účastníkům řízení dle § 27 odst. 1 správního řádu:**

Bc. Nikol Krejčová, Dukelských Hrdinů 763/28, Ústí nad Labem 400 01

**Účastníkům řízení dle § 27 odst. 3 správního řádu:**

město Kadaň, Mírové náměstí 1, 432 01 Kadaň

obec Křimov, Křimov, 37, 43001 Chomutov

vlastní

Krajský úřad Ústeckého kraje, Velká Hradební 3118/48, 400 02 Ústí nad Labem

Tel.: +420 475 657 111

Fax: +420 475 200 245

Url: [www.kr-ustecky.cz](http://www.kr-ustecky.cz)

E-mail: [urad@kr-ustecky.cz](mailto:urad@kr-ustecky.cz)

strana 3 / 3



## Újezdni úřad vojenského újezdu Hradiště

ul. 1. máje č.5/3, 360 06 Karlovy Vary ; [www.voujezd-hradiste.cz](http://www.voujezd-hradiste.cz)  
tel.: +420 973 349 917, fax.: +420 973 349 910, e-mail: [svetyskova.hradiste@email.cz](mailto:svetyskova.hradiste@email.cz)

PRACOVISŤE ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

Spis.zn. 28/2013/1513 ŽP  
Čj.došlého dokumentu:  
Čj.28-18 / 2013/ 1513 ŽP

V Karlových Varech dne 6. května 2012

Vyřizuje: Bc. Šárka Vetyšková

Žadatel

Katedra botaniky PřF UK v Praze  
Benátská 2  
128 01 Praha 2

dále dle rozdělovníku

### Věc: Žádost

Újezdni úřad vojenského újezdu Hradiště, jako orgán ochrany přírody, příslušný podle ustanovení § 78a odst.1 zákona ČNR č.114/1992 Sb., o ochraně přírody a krajiny ve znění pozdějších předpisů, obdržel dne 19.04.2013 žádost ve věci povolení výjimky dle § 56 odst. 2 písm.d) zákona ČNR č. 114/1992 Sb., o ochraně přírody a krajiny, ve znění pozdějších předpisů (dále jen „zákon“), ze základních podmínek ochrany kriticky ohroženého koniklece otevřeného (*Pulsatilla patens subsp.patens*) a silně ohroženého koniklece lučního českého (*Pulsatilla pratensis subsp.bohemica*) stanovených § 49 odst.1 ZOPK, konkrétně o povolení výjimky ze zákazů sbírat, trhat, držet, pěstovat, dle § 56 odst.2 písm.d) pro účely výzkumu a vzdělávání.

Podání žádosti učinili- **Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědná fakulta, katedra botaniky, Benátská 2, 128 01 Praha 2**

### Stručné zdůvodnění žádosti:

Výjimka je požadována pro záměr ochrany kriticky ohroženého koniklece otevřeného (*Pulsatilla patens subsp.patens*) a silně ohroženého koniklece lučního českého, (*Pulsatilla pratensis subsp.bohemica*) v souvislosti se studiem dynamiky jejich populací a možnosti ohrožení hybridizací, studium je součástí diplomové práce na téma „Mezidruhová hybridizace *Pulsatilla patens* a *Pulsatilla pratensis* – význam pro druhovou ochranu. Oba druhy se dají odlišit na základě rozdílné velikosti genomu, jejich hybrid by pak měl mít velikost genomu střední k velikosti genomu rodičovských. Jako nejvhodnější cytogenetická metoda se jeví průtoková cytometrie, která umožňuje nedestruktivní cestou provést karyologický screening všech jedinců. Úvedným způsobem bude možné kriticky zhodnotit dynamiku jednotlivých populací včetně případné frekvence a dynamiky mezidruhové hybridizace a stanovit tak potenciální riziko genetické eroze těchto ohrožených druhů. Jedná se o provádění výzkumu na lokalitách vrch Havraň, Humnický vrch, Dubový vrch, lokalita Pastvina u obce Brodce a lokalita mezi vrchem Hůrka a Malešským vrchem.



Újezdni úřad vojenského újezdu Hradiště po prostudování výše uvedené žádosti sděluje následující vyjádření s podmínkami:

- Podaná žádost ve věci povolení výjimky dle § 56 odst. 2 písm.d) zákona ČNR č. 114/1992 Sb., o ochraně přírody a krajiny, ve znění pozdějších předpisů (dále jen „zákon“), ze základních podmínek ochrany kriticky ohroženého koniklece otevřeného (*Pulsatilla patens subsp.patens*) a silně ohroženého koniklece lučního českého (*Pulsatilla pratensis subsp.bohemica*) **nepodléhá správnímu řízení a nebude vydána**, neboť záměrem nedojde k porušení § 56 odst.2 písm.d) zákona a také dle § 49 ods. 1 zákona nedojde k poškození základních podmínek ochrany zvláště chráněných rostlin tj. nedojde zde ke sběru rostlin, trhání, vykopávání, poškození a nebo jinému ničení při jejich vývoji atd.
- K výše uvedenému záměru bude použita cytogenetická metoda průtokové cytometrie, která umožňuje nedestruktivní cestou provést karyologický screening všech jedinců.
- Budou dodrženy další body uvedené v odůvodnění podané žádosti.
- Osoby, které budou provádět výše uvedený záměr požádají o povolení ke vstupu na území vojenského újezdu Hradiště.
- Účasten záměru bude ekolog ÚÚřVÚ Hradiště a zástupce AOPK pracoviště Karlovy Vary .
- Upozorňujeme na lokalitu Pastvina u obce Brodce, že se nenachází ve vojenském újezdu Hradiště a tudíž nepodléhá našemu vyjádření.
- V případě porušení podmínek ve vydaném vyjádření se vystavujete riziku porušení zákona č. 114/1992 Sb., o ochraně přírody a krajiny.

Referent životního prostředí  
oprávněná úřední osoba  
Bc. Šárka V e t y š k o v á

ÚJEZDNÍ ÚŘAD  
VOJENSKÉHO ÚJEZDU HRADIŠTĚ  
1. máje 5/3, telefon 973 349 904,5  
360 06 KARLOVY VARY - Dvory

Rozdělovník:

Pořízeno 4 výtisků o 2 listech:

Účastníci řízení: (na doručení)

1. Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědná fakulta, katedra botaniky, Benátská 2, 128 01 Praha 2,
2. MO/VUSS Praha, Hradební 12/772, P.O.BOX č.3, 110 15 Praha 1

Ostatní:

3. AOPK, středisko Karlovy Vary, Drahomířino náměstí 197/16, 360 09
4. ÚÚřVÚ Hradiště k založení do spisu

Vypraveno dne: 6.05.2013